

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 10892-GBF	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT ISA 220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/07115	Internationales Anmeldedatum (Tag Monat Jahr) 25/07/2000	Frühestes Prioritätsdatum (Tag Monat Jahr) 30/09/1999

Anmelder

GESELLSCHAFT FÜR BIOTECH. FORSCHUNG MBH (GBF)

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. ☐ **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

P/EP 00/07115

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGENSTANDES

IPK 7 C12N15/55 C12N9/18 C12N5/12 C07K16/40 C12P7/64

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssysteme)

IPK 7 C12N C12P C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EMBASE, EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BIOTECHNOLOGY ABS, SCISEARCH, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BACHMANN S L ET AL: "PURIFICATION AND COOPERATIVE ACTIVITY OF ENZYMES CONSTITUTING THE XYLAN-DEGRADING SYSTEM OF THERMOMONOSPORA-FUSCA" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 57, Nr. 8, 1991, Seiten 2121-2130, XP000979271 ISSN: 0099-2240	1-3, 7-11,13
Y	Zusammenfassung Seite 2125, linke Spalte, Absatz 2 -Seite 2126, linke Spalte; Abbildung 4; Tabelle 3 --- -/--	4-6,12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *F* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *I* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

I Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Fähigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Fähigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Februar 2001

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

21/02/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31) 70 340 2040, Tx: 31 651 epo.nl
Fax: (+31) 70 340 3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gurdjian, D



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEKÜNDIGTE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitrag, Anspruch, Nr.
X	HOLLICK G E: "ENZYMATIC PROFILES OF SELECTED THERMOPHILIC ACTINOMYCETES" MICROBIOS. Bd. 35, Nr. 141-142, 1982, Seiten 187-196. XP000979248 ISSN: 0026-2633	1.2. 7-11.13
Y	Zusammenfassung; Tabelle 3	4-6, 12. 14.15
X	--- MCCARTHY A J ET AL: "Xylan-degrading enzymes produced by the thermophilic actinomycete Thermomonospora fusca" PROG.BIOTECHNOL., 1992. Bd. 7, 1992, Seiten 309-13, XP000979410 Zusammenfassung; Tabelle 1	1-3. 7-11.13
Y	--- CRUZ HUGO ET AL: "Sequence of the Streptomyces albus G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family." GENE (AMSTERDAM). Bd. 144, Nr. 1, 1994, Seiten 141-142. XP002159117 ISSN: 0378-1119 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Abbildung 1	4-6
Y	--- PEREZ CRISTINA ET AL: "Cloning, characterization, and expression in Streptomyces lividans 66 of an extracellular lipase-encoding gene from Streptomyces sp. M11." GENE (AMSTERDAM). Bd. 123, Nr. 1, 1993, Seiten 109-114. XP002159118 ISSN: 0378-1119 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Abbildung 3	4-6
Y	--- DE 197 06 023 A (BAYER AG) 20. August 1998 (1998-08-20) Zusammenfassung; Ansprüche 1-6	14.15
Y	--- WO 95 25707 A (BIOTAL LTD :MANN STEPHEN PHILIP (GB); WARD JOHN STEWART (GB)) 28. September 1995 (1995-09-28)	12
A	Ansprüche 1.8	7-11. 13-15
	--- -/--	



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich, mit Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruchs Nr.
A	<p>KEMPF, ALEXANDER ET AL: "Screening of thermophilic actinomycetes for biopolymer degrading enzymes"</p> <p>DECHEMA BIOTECHNOL. CONF. (1989), 3(PT. A, JT. MEET. SIM DECHEMA, PRESENTATION BIOCHEM. LAB., MICROB. PRINCK.BIOPROCESSES, APPL. GENET.), 159-62</p> <p>XP000979280</p> <p>Zusammenfassung: Tabelle 3 -----</p>	<p>1-3, 7-11, 13-15</p>



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2 5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day month year) 12 July 2001 (12.07.01)	
International application No. PCT/EP00/07115	Applicant's or agent's file reference 10892-GBF
International filing date (day/month/year) 25 July 2000 (25.07.00)	Priority date (day/month/year) 30 September 1999 (30.09.99)
Applicant DECKWER, Wolf-Dieter et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

10 April 2001 (10.04.01)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Odile ALIU Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

EP 00/07115

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members:	Publication date
DE 19706023 A	20-08-1998	AU 6099398 A WO 9836086 A EP 0968300 A	08-09-1998 20-08-1998 05-01-2000
WO 9525707 A	28-09-1995	AT 188203 T DE 69514218 D EP 0751923 A	15-01-2000 03-02-2000 08-01-1997



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Handwritten mark

Applicant's or agent's file reference 10892-GBF	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT IPEA 416)	
International application No. PCT EP00/07115	International filing date (day month year) 25 July 2000 (25.07.00)	Priority date (day month year) 30 September 1999 (30.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/55		
Applicant GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF)		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 1-4 sheets

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 10 April 2001 (10.04.01)	Date of completion of this report 18 January 2002 (18.01.2002)
Name and mailing address of the IPEA EP	Authorized officer
Facsimile No	Telephone No



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT EP00 07115

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originals filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendment)*

☐ the international application as originally filed

☒ the description, pages 1-19, as originally filed,

pages _____, filed with the demand,

pages _____, filed with the letter of _____,

pages _____, filed with the letter of _____,

☐ the claims, Nos. _____, as originally filed,

Nos. _____, as amended under Article 19,

Nos. _____, filed with the demand,

Nos. 1-16, filed with the letter of 28 December 2001 (28.12.2001),

Nos. _____, filed with the letter of _____,

☒ the drawings, sheets fig 1-6-6-6, as originally filed,

sheets fig _____, filed with the demand,

sheets fig _____, filed with the letter of _____,

sheets fig _____, filed with the letter of _____,

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____,

☐ the claims, Nos. _____,

☐ the drawings, sheets fig _____,

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

E1 7111

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement

1 Statement

Novelty (N)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2 Citations and explanations

- 11: BRACHMANN S L ET AL: 'PURIFICATION AND COOPERATIVE ACTIVITY OF ENZYMES CONSTITUTING THE XYLAN-DEGRADING SYSTEM OF THERMOMONOSPOREA-FUSCA' APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol. 57, No. 4, 1991, pages 1111-1121, XP00078271 ISSN: 0099-2240
- 12: HILLIG K E: 'ENZYMATIC PROFILES OF SELECTED THERMOPHILIC ACTINOMYCETES' MICROBIOLOGY, Vol. 135, No. 1, 1991, pages 147-156, XI: 047848 ISSN: 0027-1632
- 13: KLEBERG I ET AL: 'The degradation of Aliphatic-Aromatic Copolyesters by Thermotoga fusca and other thermophilic compost isolates' APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 1994, Vol. 60, No. 5, pages 1731-1738
- 14: DEUT HIG ET AL: 'Sequence of the Streptomyces albus 8 lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family.' GENE AMSTERDAM, Vol. 144, No. 1, 1994, pages 141-142, XI: 018317 ISSN: 0378-1119, mentioned in the application.
- 15: ISSAC CHRISTINA ET AL: 'Cloning, characterization, and expression in Streptomyces lividans of an extracellular lipase-encoding gene from Streptomyces sp. M11.' GENE AMSTERDAM, Vol. 173, No. 1, 1994, pages 113-114, XI: 018415 ISSN: 0378-1119,



MENTIONED IN THE APPLICATION.

It was not cited in the international search report. A copy of the document was never attached to the written report.

The present application relates to an enzyme that cleaves ester groups from polypeptides and that is isolated from *Thermotoga sp.* as well as antibodies against the same, and compositions and uses of said enzyme.

The claimed enzymes according to claims 1-5 are not anticipated by D1-D3 and are therefore novel pursuant to PCT Article 33.1. The same issue also applies to claims 7-10, which refer to claim 1-5. In addition, documents D1-D3 do not provide a person skilled in the art with enough evidence that the enzymes according to claim 1 exist, or that if they did, they could be isolated without unreasonable effort. Therefore claims 1-5 also involve an inventive step pursuant to PCT Article 33.1. The same applies to claims 7-10, all of which refer directly or indirectly to claims 1-5.





VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWES

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 22 JAN 2002

WIPO PCT

114

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 10892-GBF	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07115	Internationales Anmeldedatum (Tag Monat/Jahr) 25/07/2000	Prioritätsdatum (Tag Monat/Tag) 30/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/55		
Anmelder GESELLSCHAFT FÜR BIOTECH. FORSCHUNG MBH (GBF)		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 1-4 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 10.04.2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 18.01.2002
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel: +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Steffen, P Tel. Nr. +49 89 2399 7307 



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-19 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-16 eingegangen am 28/12/2001 mit Schreiben vom 27/12/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/6-6/6 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-2, eingereicht mit Schreiben vom 16-10-2000.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.



4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt



Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- D1: BACHMANN S L ET AL: 'PURIFICATION AND COOPERATIVE ACTIVITY OF ENZYMES CONSTITUTING THE XYLAN-DEGRADING SYSTEM OF THERMOMONOSPORA-FUSCA' APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 57, Nr. 8, 1991, Seiten 2121-2130, XP000979271 ISSN: 0099-2240
- D2: HOLLICK G E: 'ENZYMATIC PROFILES OF SELECTED THERMOPHILIC ACTINOMYCETES' MICROBIOS, Bd. 35, Nr. 141-142, 1982, Seiten 187-196, XP000979248 ISSN: 0026-2633
- D3: KLEEBERG I ET AL.: 'Biodegradation of Aliphatic-Aromatic Copolyesters by Themomonospora fusca and other thermophilic compost isolates' APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY., 1998, Bd. 64(5), Seiten 1731-1735.
- D4: CRUZ HUGO ET AL: 'Sequence of the Streptomyces albus G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family.' GENE (AMSTERDAM), Bd. 144, Nr. 1, 1994, Seiten 141-142, XP002159117 ISSN: 0378-1119 in der Anmeldung erwähnt
- D5: PEREZ CRISTINA ET AL: 'Cloning, characterization, and expression in Streptomyces lividans 66 of an extracellular lipase-encoding gene from Streptomyces sp. M11.' GENE (AMSTERDAM), Bd. 123, Nr. 1, 1993, Seiten 109-114, XP002159118 ISSN: 0378-1119 in der Anmeldung erwähnt

Das Dokument D3 wurde im internationalen Recherchenbericht nicht angegeben. Eine Kopie des Dokuments wurde dem schriftlichen Bescheid beigelegt.

Die vorliegende Anmeldung betrifft ein Enzym welches Estergruppen aus Polyestern spaltet und aus Themomonospora fusca isoliert wird, sowie Antikörper gegen dasselbe, Zusammensetzungen und Verwendungen des besagten Enzyms.

Die beanspruchten Enzyme nach Anspruch 1-5, werden nicht aus D1-D5 vorweggenommen und sind damit neu nach Artikel 33(2) PCT. Das gleiche gilt demnach



für Ansprüche 7-16, welche sich auf Ansprüche 1-6 beziehen. Zudem werden dem Fachmann nicht genügend Hinweise in D1-D5 geliefert, daß die Enzyme nach Anspruch 1 existieren, und gegebenenfalls ohne unzumutbaren Aufwand isoliert werden können. Somit beruhen Ansprüche 1-6 auch auf erfinderischer Tätigkeit gemäß Artikel 33(2) PCT. Das gleiche gilt für Ansprüche 7-16, die sich allesamt direkt oder indirekt auf Ansprüche 1-6 beziehen.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Das estergruppenspaltenden Enzym aus Ansprüchen 1-3 ist lediglich durch ein Prozeß des Erhalten beschrieben, was zwar ausreichen kann das Produkt vom Stand der Technik abzugrenzen, was aber nicht unbedingt ausreicht um ein Proteinprodukt hinlänglich und klar zu definieren. Hierzu bedarf es meist zusätzlicher konkreter Informationen von nachmessbaren biochemischen sowie biophysikalischen Eigenschaften, sowie auch von Sequenzen.

In Anspruch 6 ist der Ausdruck "eines Teils" extrem unpräzise, so daß sich hier der Umfang des Anspruches nicht klar eingrenzen läßt.



Patentansprüche

1. Estergruppen von Polyestern spaltendes Enzym, das erhältlich ist, indem der Mikroorganismus *Thermomonospora fusca* in einem geeigneten Nährmedium in Anwesenheit eines Polyesters als Induktor kultiviert, aus dem Nährmedium ein Überstand mit einem Gehalt an einem Estergruppen von Polyestern spaltenden Enzym gewonnen, das Enzym mit üblichen biochemischen Reinigungsmethoden gereinigt und danach isoliert wird.

2. Estergruppenspaltendes Enzym nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem Mikroorganismus um einen *Thermomonospora-fusca*-Stamm handelt, der bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter der Zugangsnummer DSM 43793 hinterlegt ist.

3. Estergruppenspaltendes Enzym nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das Enzym aus dem Nährmedium isoliert wird, indem aus dem Nährmedium ein enzymhaltiger Kulturüberstand gewonnen wird, der gegebenenfalls konzentriert werden kann, und

durch Chromatographie, insbesondere durch Ionenaustausch- und/oder hydrophobe Interaktionschromatographie, das Enzym gereinigt wird.

4. Estergruppenspaltendes Enzym nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das Enzym durch folgende Parameter gekennzeichnet ist:



Molmasse: 27400 D (durch SDS-Gelelektrophorese bestimmt) bzw.
28200 D (aus der Aminosäuresequenz berechnet)

Temperaturoptimum/-bereich: 65°C (30-80°C),

Temperaturstabilität 70°C/30 min,

pH-Optimum/-bereich: 6-7 (4- >8),

Isoelektrischen Punkt: 6,4.

5. Estergruppenspaltendes Enzym nach einem der vorherigen
Ansprüche, gekennzeichnet durch folgende Aminosäuresequenz:

ANPYERGPNP TDALLEASSG PFSVSEENV S RLSASGFGGG TIYYPREN
NTYGAVAISP GYTGTEASIA WLGERIASHG FVVITIDTIT TLDQPDSRAE
QLNAALNHMI NRASSTVRSR IDSSRLAVMG HSMGGGGTLR LASQRPDLKA
AIPLTPWHLN KNWSSVTVP T LIIGADLDTI APVATHAKPF YNSLPSSISK
AYLELDGATH FAPNIPNKII GKYSVAWLKR FVDNDTRYTQ FLCPGPRDGL
FGEVEEYRST CPF

oder

durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren
entstandene Mutanten ergeben, die Estergruppen von Polyestern
spalten (isofunktionelle Enzyme).



6. Synthetisches Peptid oder Protein mit der Aminosäuresequenz des estergruppenspaltendes Enzyms nach Anspruch 5 oder eines Teils dieser Sequenz davon.

7. Polyklonaler Antikörper, der spezifisch gegen ein esterspaltendes Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder gegen ein synthetisches Peptid oder Protein nach Anspruch 6 gerichtet ist.

8. Monoklonaler Antikörper, der spezifisch gegen ein esterspaltendes Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder gegen ein synthetisches Peptid oder Protein nach Anspruch 6 gerichtet ist.

9. Hybridomzelle, die einen monoklonalen Antikörper nach Anspruch 8 bildet.

10. Estergruppenspaltende Zusammensetzung, die ein estergruppenspaltendes Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 und/oder ein synthetisches Peptid oder Protein nach Anspruch 6 sowie gegebenenfalls zusätzliche Enzyme, Stabilisatoren, geeignete oberflächenaktive Substanzen und/oder geeignete organische Lösungsmittel enthält.

11. Estergruppenspaltende Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei die zusätzlichen Enzyme Hydrolasen, insbesondere Esterasen, Proteasen, Cutinasen, Lipasen, Phospholipasen und Lysophospholipasen, sind.

12. Estergruppenspaltende Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei die Hydrolasen aus unter *Pseudomonas* sp., *Rizomucor miehei*, *Candida cylindracea*, *Candida antartica*, *Asperigillus niger*, *Chromobacterium viscosum*, *Commamonas acidovorans*,



Rhizopus arrhizus und Rhizopus delamar ausgewählten Mikroorganismen stammen.

13. Verwendung eines estergruppenspaltenden Enzyms nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder eines synthetischen Peptids oder Proteins nach Anspruch 6 oder einer estergruppenspaltenden Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 10 bis 12 zum Abbau von Estergruppen enthaltenden niedermolekularen und/oder makromolekularen synthetischen oder natürlichen Verbindungen.

14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei es sich bei den Estergruppen enthaltenden makromolekularen Verbindungen um aliphatische, cycloaliphatische, aliphatisch-aromatische, teilaromatische oder aromatische Polyester bzw. Copolyester, Polyesteramide, Polyestercarbonate oder Polyesterurethane handelt, die kettenverlängert, verzweigt oder vernetzt sein können.

15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei die Estergruppen enthaltenden makromolekularen Verbindungen Copolymere, Mischungen bzw. Blends, Composites, Lamine oder Verklebungen mit anderen Werkstoffen bilden.

16. Verfahren zur Herstellung eines Estergruppen von Polyestern spaltenden Enzyms, bei dem der Mikroorganismus Thermomonospora fusca in einem geeigneten Nährmedium in Anwesenheit eines Polyesters als Induktor kultiviert, aus dem Nährmedium ein Überstand mit einem Gehalt an einem Estergruppen von Polyestern spaltenden Enzym gewonnen, das Enzym mit üblichen biochemischen Reinigungsmethoden gereinigt und danach isoliert wird.



(12) NACH DEM VERTRAG FÜR DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. April 2001 (05.04.2001)

PCT

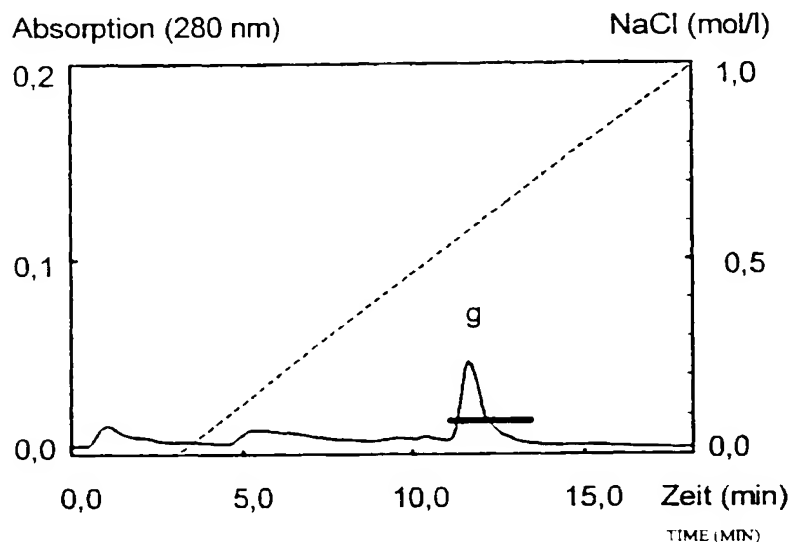
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/23581 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/55, 9/18, 5/12, C07K 16/40, C12P 7/64
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07115
- (22) Internationales Anmeldedatum: 25. Juli 2000 (25.07.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 47 286.6 30. September 1999 (30.09.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von U.S.): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).
- (72) Erfinder: und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für U.S.): DECKWER, Wolf-Dieter [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). MÜLLER, Rolf-Joachim [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). KLEEGERG, Ilona [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). VAN DEN HEUVEL, Joop [NL/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).
- (74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, 81541 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: ENZYME WHICH CLEAVES ESTER GROUPS AND WHICH IS DERIVED FROM THERMOMONOSPORA FUSCA

(54) Bezeichnung: ESTERGRUPPENSALTENDES ENZYM AUS THERMOMONOSPORA FUSCA



(57) Abstract: The invention relates to an enzyme which cleaves ester groups and which can be obtained by cultivating the microorganism *Thermomonospora fusca* in an appropriate nutrient medium, optionally in the presence of an inductor.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein estergruppensaltendes Enzym, das erhältlich ist, indem der Mikroorganismus *Thermomonospora fusca* in einem geeigneten Nährmedium, gegebenenfalls in Anwesenheit eines Induktors, kultiviert wird.

WO 01/23581 A1



(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.

— Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist: Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Estergruppenspaltendes Enzym aus Thermomonospora fusca

Die Erfindung betrifft ein estergruppenspaltendes Enzym (im folgenden auch EGS-Enzym genannt) aus Thermomonospora fusca, ein Verfahren zu dessen Herstellung sowie seine Verwendung zum Abbau bzw. zur Behandlung von Estergruppen enthaltenden Polymeren und niedermolekularen Verbindungen.

Einleitung und Stand der Technik

Polymere und makromolekulare Werkstoffe, die einem kontrollierten biologischen Abbau unterliegen können, gewinnen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Eine Reihe von derartigen Produkten sind auf dem Markt bereits im industriellen Maßstab verfügbar. Innerhalb dieser neuartigen Produkte nehmen Estergruppen enthaltende Polymere (z.B. Polyester, Polyesterurethane, Polyesteramide) eine zentrale Rolle ein. Beispiele für bioabbaubare Kunststoffe auf Polyesterbasis sind z.B. Poly(β -hydroxybutyrat-co- β -hydroxyvalerat), Poly(ϵ -caprolacton) oder Poly(butylensuccinat).

Da Polymere aufgrund ihrer Molekülgröße die äußere Membran der mikrobiellen Zellen nicht passieren können, ist der erste und in der Regel geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Abbaus eine Molmassenreduzierung (Depolymerisierung) durch extrazelluläre Enzyme. Polyester sind deshalb potentiell bioabbaubar, da die Esterbindungen grundsätzliche Angriffspunkte für solche extrazellulären hydrolysierenden Enzyme darstellen

Für aliphatische Polyester sind seit langem Untersuchungen zum biologischen Abbau mit Hilfe solcher hydrolysierenden Enzyme (z.B. Lipasen, PHB-Depolymerasen) bekannt [Tokiwa et al., Polym. Mater. Sci. Eng. 62(1990), 988-992] [Jendrossek et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 46(1996), 451-463]. Das Material wird mit einem entsprechenden Enzym unter geeigneten Bedingungen inkubiert und der Abbau über die Bildung von Spaltprodukten im umgebenden Medium oder über den Gewichtsverlust der Proben bestimmt. Für die natürlichen Polyhydroxyalkanoate wurden in der Regel hierfür speziell isolierte Hydrolysen (PHB-Depolymerasen) eingesetzt, während für den Abbau synthetischer Polyester nicht speziell für den Zweck des Polymerabbaus isolierte kommerzielle Lipasen etc. verwendet wurden.

Während viele aliphatische Polyester sich grundsätzlich als biologisch angreifbar erwiesen haben, gelten aromatische Polyester [z.B. Poly(ethylenterephthalat), Poly(propylenterephthalat), Polybutylenterephthalat)] bekanntermaßen als biologisch resistent. Um die vergleichsweise zu aliphatischen Polyestern besseren Verarbeitungs- und Anwendungseigenschaften der aromatischen Strukturen zu nutzen, sind in den letzten Jahren biologisch abbaubare aliphatische-aromatische Co-

polyester entwickelt worden und werden in industriellem Maßstab hergestellt [Presseinformation der BASF AG, Ludwigshafen, zur K'98-Messe in Düsseldorf vom 17.03.98].

Durch die Einführung der aromatischen Komponenten wird jedoch die biologische Abbaugeschwindigkeit signifikant vermindert [Müller et al., Polym. Degrad. Stab. 59 (1998), S. 203-208]. So kommen z.B. Jun et al. [Jun et al., J. Environ., Polym. Degrad. 2(1) (1994), S. 9-18] zu dem Schluß, daß Copolyester aus PET und PCL nicht signifikant durch Lipasen (z.B. Pseudomonas-sp.-Lipase) angegriffen werden.

Ein Abbau von insbesondere Polyesteramiden mit verschiedenen üblichen kommerziellen Lipasen unter technischen Aspekten ist kürzlich beschrieben worden [WO 98/36086]. In diesem Patent wird auch die Auflösung eines Copolyesters aus Butandiol, Terephthalat (40 Mol.-%) und Adipat (60 Mol.-%) beschrieben. Die vermeintlich für technische Anwendungen geeignete Reaktionen werden durch beispielweise 50 mg Enzym (Lipase aus *Candida antarctica*) zu 0,3-1,6 g eines Polyesteramides in Folien- bzw. Plattenform erreicht. Die erzielten Abbauraten liegen im Bereich von 600 mg Abbau/Woche. Für den beschriebenen Abbau des aliphatisch-aromatischen Copolyesters muß eine Enzymmenge von 1% (in 100 ml Puffer) zu einem feinen Pulver des Copolyesters gegeben werden. Trotz der durch die kleine Partikelgröße bedingten erheblich größeren Oberfläche wird hier nur ein Abbau von 230 mg/Woche erreicht.

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß aliphatisch-aromatische Copolyester durch Mikroorganismenstämme aus der Gruppe der Actinomyceten abgebaut werden können [Kleeberg et al., Appl. Environ. Polym. Degrad. 64(5) (1998), 1731-1735].

Trotzdem besteht immer noch ein Bedarf nach einem hochaktiven estergruppenspaltenden Enzym, daß Polymere auf Polyesterbasis abbauen kann.

Überraschenderweise wurde erfindungsgemäß gefunden, daß biologisch abbaubare, Polyestergruppen enthaltende Polymere, insbesondere auch aliphatisch-aromatische Copolyester, mit dem erfindungsgemäßen, im folgenden näher spezifizierten, extrazellulären Enzym aus dem zu den Actinomyceten gehörenden Mikroorganismus *Thermomonospora fusca*, insbesondere des Stammes *Thermomonospora fusca* DSM 43793, alleine oder im Gemisch mit anderen Enzymen mit einer außergewöhnlich hohen Abbaugeschwindigkeit bzw. -rate depolymerisiert und in niedermolekulare Bruchstücke zerlegt werden können.

Die Erfindung betrifft somit ein estergruppenspaltendes Enzym nach Patentanspruch 1, ein synthetisches Peptid oder Protein nach Patentanspruch 6, polyklonale bzw. monoklonale Antikörper nach Patentanspruch 7 bzw. 8, Hybridomzellen nach Patentanspruch 9, eine estergruppenspaltende Zusammensetzung nach Patentanspruch 11 sowie die Verwendung eines estergruppenspaltenden Enzyms, synthetischen Peptids oder Proteins oder einer estergruppenspaltenden Zusammensetzung nach Patentanspruch 13.

Vorteilhafte Ausführungsformen sind Gegenstand der Unteransprüche.

Konkreter, jedoch ohne Einschränkung, betrifft die Erfindung ein estergruppenspaltendes Enzym, das erhältlich ist, indem der Mikroorganismus *Thermomonospora fusca* in einem geeigneten

Nährmedium, gegebenenfalls in Anwesenheit eines Induktors, kultiviert wird.

Vorzugsweise stammt das erfindungsgemäße estergruppenspaltende Enzym aus dem *Thermomonospora-fusca*-Stamm, der bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter der Zugangsnummer DSM 43793 hinterlegt ist.

Die Kultivierung kann durch im Batch-, Fed-Batch- oder kontinuierlichen Betrieb in synthetischen oder komplexen Medien erfolgen. Die Mikroorganismen können dabei frei vorliegen oder an einem festen Träger immobilisiert sein. Grundsätzlich kommen sowohl natürliche als auch genetisch veränderte Mikroorganismen in Frage.

Geeignete Induktoren für die Ausscheidung des Enzyms sind beispielsweise die Substrate selber, z.B. aliphatische Polyester und/oder Oligoester, aliphatisch-aromatische Copolyester.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße estergruppenspaltende Enzym außerdem aus dem Nährmedium isoliert, indem aus dem Nährmedium ein enzymhaltiger Kulturüberstand gewonnen wird, beispielsweise durch Zentrifugation, der gegebenenfalls konzentriert werden kann, beispielsweise durch Ultrafiltration und/oder Ammoniumsulfatfällung, worauf mit üblichen biochemischen Reinigungsmethoden, beispielsweise durch Chromatographie, insbesondere durch Ionenaustausch- und/oder hydrophobe Interaktionschromatographie, das Enzym gereinigt wird.

Das erfindungsgemäße estergruppenspaltende Enzym aus *Thermomonospora fusca* DSM 43793 ist durch folgende Parameter gekennzeichnet:

Molmasse: 27400 D (durch SDS-Gelelektrophorese bestimmt) bzw. 28200 D (aus der Aminosäuresequenz berechnet)

Temperaturoptimum/-bereich: 65°C (30-80°C),

Temperaturstabilität: 70°C/30 min,

pH-Optimum/-bereich: 6-7 (4- >8),

Isoelektrischen Punkt: 6,4.

Die Substratspezifität umfaßt Estergruppen enthaltende Polymere, Triglyceride, Phthalsäureester.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform hat das erfindungsgemäße estergruppenspaltende Enzym aus *Thermomonospora* DSM 43793 die folgende Aminosäuresequenz:

ANPYERGPNP TDALLEASSG PFSVSEENV S RLSASGF GGG TIYPREN

NTYGAVAI SP GYTGTEASIA WLGERIASHG FVVITIDTIT TLDQPDSRAE

QLNAALNHMI NRASSTVRSR IDSSRLAVMG HSMGGGGTLR LASQRPDLKA

AIPLTPWHLN KNWSSVTVPT LIIGADLDTI APVATHAKPF YNSLPSSISK

AYLELDGATH FAPNIPNKII GKYSVAWLKR FVDNDTRYTQ FLCPGPRDGL

FGEVEEYRST CPF

oder

durch eine durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren entstandene mutierte Aminosäuresequenz, die ein isofunktionelles Enzym ergibt.

Die obige Aminosäuresequenz oder Teile davon können selbstverständlich auch synthetisch nach herkömmlichen Verfahren hergestellt werden, beispielsweise mit einem automatischen "Peptide-Synthesizer".

Die Erfindung betrifft ferner polyklonale und monoklonale Antikörper, die spezifisch gegen ein erfindungsgemäßes ester-spaltendes Enzym oder gegen ein entsprechendes synthetisches Peptid oder Protein mit gleicher Funktion und/oder Aminosäuresequenz gerichtet sind, sowie Hybridomzellen, welche die monoklonalen Antikörper bilden. Die Herstellung von poly- oder monoklonalen Antikörpern bzw. die Herstellung der die letzteren bildenden Hybridome ist seit langem bekannt (vgl. beispielsweise: E. Harlow, D. Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; E. Lidell, I. Weeks, "Antikörper-Techniken", Spektrum Akademischer Verlag, 1996), so daß es keiner weiteren Erörterung bedarf.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung estergruppenspaltende Zusammensetzungen, die ein erfindungsgemäßes estergruppenspaltendes Enzym und/oder ein entsprechendes synthetisches Peptid oder Protein mit gleicher Funktion und/oder Aminosäuresequenz sowie gegebenenfalls zusätzliche Enzyme, Stabilisa-

toren, geeignete oberflächenaktive Substanzen und/oder geeignete organische Lösungsmittel enthält.

Vorzugsweise handelt es sich bei den zusätzlichen Enzymen um Hydrolasen, insbesondere Esterasen, Proteasen, Cutinasen, Lipasen, Phospholipasen und Lysophospholipasen.

Besonders bevorzugt stammen diese Hydrolasen aus unter *Pseudomonas* sp., *Rizomucor miehei*, *Candida cylindracea*, *Candida antartica*, *Aspergillus niger*, *Chromobacterium viscosum*, *Comamonas acidovorans*, *Rhizopus arrhizus* und *Rhizopus delamar* ausgewählten Mikroorganismen. Besonders geeignet sind auch die in WO98/36086 (Bayer AG), auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird, offenbarten Mikroorganismen.

Die Erfindung gibt außerdem die Verwendung eines erfindungsgemäßen estergruppenspaltenden Enzyms oder eines synthetischen Peptids oder Proteins mit gleicher Funktion und/oder Aminosäuresequenz oder einer erfindungsgemäßen estergruppenspaltenden Zusammensetzung zum Abbau von Estergruppen enthaltenden niedermolekularen und/oder makromolekularen synthetischen oder natürlichen Verbindungen an.

Vorzugsweise handelt es sich bei den Estergruppen enthaltenden makromolekularen Verbindungen um aliphatische, cycloaliphatische, aliphatisch-aromatische, teilaromatische oder aromatische Polyester bzw. Copolyester, Polyesteramide, Polyestercarbonate oder Polyesterurethane, die kettenverlängert, verzweigt oder vernetzt sein können.

Die Estergruppen enthaltenden makromolekularen Verbindungen können beliebige Form haben und beispielsweise Copolymere,

Mischungen bzw. Blends, Composites, Lamine oder Verklebungen mit anderen Werkstoffen bilden.

In Verfahren zum Abbau von Estergruppen enthaltenden niedermolekularen und/oder makromolekularen (polymeren) Verbindungen unter Verwendung des erfindungsgemäßen estergruppenspal tenden Enzyms (oder eines anhand der Aminosäuresequenz synthetisch hergestellten Enzyms) oder einer dieses enthaltenden Zusammensetzung können Auflösungsgeschwindigkeiten erreicht werden, die denen von bislang bekannten Systemen deutlich überlegen sind und eine technische Nutzung der enzymatischen Behandlung von Estergruppen enthaltenden Polymeren ermöglichen. Dies gilt insbesondere für aliphatisch-aromatische Copolyester und Polyester-Blends, die eine hohe wirtschaftliche Bedeutung haben.

Die Verwendung des erfindungsgemäßen estergruppenspal tenden Enzyms (oder eines anhand der Aminosäuresequenz synthetisch hergestellten Enzyms) oder einer diese enthaltenden Zusammensetzung zur Behandlung der oben bzw. im folgenden genannten Polymeren in technisch relevanten Formen, beispielsweise Folien, Spritzgußteile, Beschichtungen, Lamine, Schäumen, Partikel, Verklebungen, kann zur Erhöhung der Metabolisierungsgeschwindigkeit durch Mikroorganismen, zur Aufarbeitung von Produkten im Rahmen eines Recyclings (z.B. zum Lösen von Verklebungen oder Entfernen von Beschichtungen) zur Rückgewinnung von Polymerbausteinen aus bioabbaubaren Polymeren oder zur Oberflächenmodifizierung von Produkten aus Polyestern dienen.

Die Behandlung der Polymeren mit einer geeigneten Enzymformulierung, beispielsweise in Form eines rohen Kulturüberstandes

von *Thermomonospora fusca*, der gegebenenfalls konzentriert werden kann, eines gereinigten Enzyms oder eines synthetischen Enzyms oder einer diese enthaltenden Zusammensetzung, kann beispielsweise in wäßriger Lösung oder durch Auftragen der Enzymformulierung auf die Polymermaterialien erfolgen.

Niedermolekulare Esterverbindungen spielen als Additive in verschiedenen Polymeren eine Rolle. Auch solche Verbindungen lassen sich mit dem erfindungsgemäßen Enzym spalten.

Die durch das erfindungsgemäße Enzym (oder durch ein anhand der Aminosäuresequenz synthetisch hergestellten Enzyms) und/oder die diese enthaltende Zusammensetzung abbaubaren estergruppenhaltigen Polymeren umfassen neben den bereits oben genannten beispielsweise folgende:

Estergruppen enthaltende synthetische und natürliche Polymere, insbesondere Lignine, Lignocellulose, Cutin, Suberin, aliphatische Polyester, insbesondere die in WO98/36086 (Bayer AG), auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird, offenbaren, besonders bevorzugt Polycaprolacton, aromatische oder teilaromatische Copolyester, insbesondere die in WO98/36086 (Bayer AG) offenbaren, besonders bevorzugt Terephthalsäure enthaltende, ganz besonders bevorzugt Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure (BTA), besonders bevorzugt mit einem Anteil von 30-70 Mol-% Terephthalsäure, Polyesteramide, insbesondere die in WO98/36086 (Bayer AG) offenbaren, Polymere, die Urethan- und Estergruppen enthalten, d. h. Polyesterurethane, und segmentierte Polyurethane.

Die Polyester können kettenverlängert, verzweigt oder vernetzt sein.

Besonders bevorzugte konkrete Polyester sind Poly(propylensuccinat), Poly(butylensuccinat), Poly(butylensuccinat-co-ethylensuccinat), ein Copolymer aus Bernsteinsäure/Adipinsäure/1,2-Ethandiol/1,4-Butandiol, Copolymere aus 1,4-Butandiol/Adipinsäure/Terephthalsäure.

Die durch das erfindungsgemäße Enzym (oder durch ein anhand der Aminosäuresequenz synthetisch hergestellten Enzyms) und/oder die diese enthaltende Zusammensetzung abbaubaren estergruppenhaltigen Polymeren können beispielsweise vorliegen als:

Copolymere oder Gemische (Blends) aus zwei oder mehreren der oben genannten Polymeren,

Composits oder Lamine aus zwei oder mehreren der oben genannten Polymeren oder deren Copolymeren oder Blends,

Composits, Lamine oder Verklebungen mit natürlichen oder modifizierten natürlichen polymeren Werkstoffen, insbesondere Stärke und/oder Cellulose (z. B. Papier),

Composits, Lamine oder Verklebungen mit anderen, nicht notwendigerweise bioabbaubaren Werkstoffen (z.B. Glas),

Polymerformulierungen, die übliche Füllmittel, Faserverstärkungen, Hilfsmittel, Stabilisatoren enthalten.

Die erfindungsgemäße Verwendung umfaßt die Behandlung von Polymeren in Form von Partikeln, Suspensionen, Emulsionen, Beschichtungen, Verklebungen, Filmen, Formkörpern, Fasern oder

Vliesen, Geweben, Schäumen. Die Materialien können chemisch, thermisch oder mechanisch vorbehandelt oder unbehandelt eingesetzt werden.

Das Enzym wird beispielsweise in gepufferter Lösung oder in ungepufferter Lösung, gegebenenfalls unter Einstellung des pH-Wertes verwendet.

Die Anwendung erfolgt beispielsweise durch Einbringen von Estergruppen enthaltenden Substanzen in geeignete Enzymlösungen oder durch Aufbringen einer geeigneten Enzymformulierung auf entsprechende Substanzoberflächen.

Weitere Verwendungsmöglichkeiten des erfindungsgemäßen Enzyms betreffen die Behandlung der oben definierten Materialien zum Zweck der Vorbehandlung im Zuge einer Entsorgung, die Behandlung der Materialien zur Trennung von Produktkomponenten, die Behandlung der Materialien zum Zweck der Rückgewinnung einzelner oder aller Materialbausteine und die Behandlung von Materialien zum Zweck der Änderung von Oberflächeneigenschaften.

Die folgenden Beispiele dienen zur Veranschaulichung der Erfindung und sind nicht als Beschränkung aufzufassen.

1. Kultivierung von Thermomonospora fusca DSM 43793.

Ein steriler mit Alukappen verschließbarer Kulturkolben ohne Schikanen wird zwei Zentimeter hoch mit sterilem Medium (entsprechend DIN V 54900, Teil 2) gefüllt. In den Kolben werden 3 g/l eines aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäureester und Adipinsäure synthetisierten Copolyesters gegeben und mit 1 Vol.-%

1 des Inoculums aus einer Vorkultur von *Thermomonospora fusca* beimpft. Die Kultur wird 18 h bei 55°C auf einem Rundschüttler mit 120 Upm inkubiert.

Nach Abbruch der Kultur werden die Feststoffe mit 8000 x g bei 10°C 20 min abzentrifugiert. Der Überstand enthält das esterspaltende Enzym.

2. Abbau eines aliphatisch-aromatischen Copolyesters mit *Thermomonospora fusca* im Kulturüberstand.

Thermomonospora fusca DSM 43793 wird in einem Mineralsalzmedium (siehe Beispiel 1) 24,8 h bei 55°C kultiviert. 2 ml des organismenfreien Kulturüberstandes werden in eine Reagenzglas gegeben. Ein runder Polymerfilm (Durchmesser 0,9 cm) aus einem Copolyester aus Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure (40 Mol.-% Terephthalsäure in der Säurekomponente) wird in den Kulturüberstand gegeben und 24 Stunden bei 55°C inkubiert. Der Gewichtsverlust des Films beträgt danach 2,575 mg/(cm² Oberfläche).

3. Isolierung des erfindungsgemäßen esterspaltenden Enzyms.

Konzentrierung:

Der Kulturüberstand aus Beispiel 1 wird in einer Amicon-Ultrafiltrationskammer (Volumen: 50 ml, Filtrationsfläche: 47 mm²) unter einem Druck von 3 bar und einer Membran mit einem Cut-off von 10 kDa auf 5% des ursprünglichen Volumens konzentriert.

Die weitere Reinigung erfolgt mit Hilfe einer Standard-FPLC-Anlage "LCC-Plus" mit automatischer Äquilibration, Injektion und Elution (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Das konzentrierte Protein im Kulturüberstand (2,1 mg) wird in einem ersten Schritt über eine Ionenaustauschersäule gereinigt.

Parameter:

Säule: UNO-S1-Säule (Säulenvolumen 1,3 ml, BioRad, München)

Startpuffer: 20 mM Citratpuffer (pH 4,0)

Elution: (linearer Gradient) 1 M NaCl im Startpuffer

Flußrate: 2 ml/min

Figur 1 zeigt das Elutionsprofil, wobei der schwarze Balken die Fraktionen markiert, die estergruppenspaltende Aktivität aufweisen.

In einem zweiten Schritt werden durch Ionenaustauschchromatographie erhaltene und Aktivität aufweisende Fraktionen durch hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) weiter gereinigt.

116 µg Protein aus durch Ionenaustauschchromatographie erhaltenen Fraktionen werden auf eine Phenylsepharosesäule aufgetragen

Säule: Phenylsepharose-CL4B-Säule (Säulenvolumen: 1,14 ml, Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Startpuffer: 0,5 M Ammoniumsulfat in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,1)

Elution: (Stufengradient) 30% Isopropanol in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,1)

Flußrate: 0,3 ml/min.

Figur 2 zeigt das Elutionsprofil, wobei der schwarze Balken die Fraktionen markiert, die estergruppenspaltende Aktivität aufweisen.

Der Kulturüberstand weist eine spezifische Aktivität von 3,3 U/mg auf. Nach der Ionenaustauschchromatographie wird eine spezifische Aktivität von 218 U/mg und nach der HIC eine von 360 U/mg erhalten.

Charakterisierung des erfindungsgemäßen Enzyms.

Figur 3 zeigt die Aminosäuresequenz des erfindungsgemäßen Enzyms und das "Alignement" zum Sequenzvergleich mit der Triacylglycerol-Lipase aus *Streptomyces albus* G und der Triacylglycerol-Acylhydrolase aus *Streptomyces* sp. M11. Das "Multiple Alignment" wurde mit dem Programm "PileUp" erstellt (Wisconsin Package, Version 9.1, Genetics Computer Group, Madison, WI, USA). Voneinander abweichende Aminosäuren an gleichen Positionen sind schattiert dargestellt. Die schwarz umrandete Box markiert eine hochkonservierte Aminosäuresequenz aus dem Bereich des aktiven Zentrums von Lipasen. Die Sequenzen der beiden *Streptomyces*-Stämme stammen aus der SP-TREMBL-Datenbank (Release 7.0, 08/1998): Q56008 (*Streptomyces* sp. M11), Q59798 (*Streptomyces albus* G).

Zur Aminosäuresequenzierung wurde das EGS-Enzym von den nach der Reinigung noch vorhandenen Fremdproteinen isoliert. Dies erfolgte durch Auftrennung der Proteine mittels präparativer SDS-Gelelektrophorese und Übertragung auf eine PVDF-Membran durch Western-Blotting. Nach der Färbung der Proteinbanden wurde die Bande des Enzyms aus der Membran ausgeschnitten und sequenziert.

Zur Bestimmung der Gesamtsequenz wurde das Enzym mit Trypsin und GIuC verdaut. Die Trennung der entstandenen Peptide erfolgte durch HPLC ("reversed phase"). Die N-terminale Sequenz und die Peptidfraktionen aus der Verdauung der BTA-Hydrolase wurden über einen "Edman-Abbau" in einem "Applied Biosystems 473A Sequencer" ("gas-phase-mode") oder in einem "494A Procise HT Sequencer" ("gas-phase"- und "pulsed-liquid-mode") mit Standardprogrammen des Herstellers analysiert.

Durch Sequenzüberlappung und durch Vergleich der Teilsequenzen des EGS-Enzyms mit den Aminosäuresequenzen zweier bekannter Streptomyces-Lipasen wurde die Gesamtsequenz des Enzyms bestimmt.

4. Abbau von Estergruppen enthaltenen Polymeren mit dem erfindungsgemäßen estergruppenspaltenden Enzym.

Unter sterilen Bedingungen wurde in Reagenzgläsern je ein Polymerfilm ($d = 0,9$ cm) mit 1 ml der gereinigten Enzymlösung (25 µg Enzym in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1) versetzt. Die Reagenzgläser wurden 17 h bei 55°C inkubiert. Der Gewichtsverlust der Polymerfilme diente als Maß für die Enzymaktivität.

Neben dem aliphatisch-aromatischen Copolyestern ETA40:60 (40 mol% Terephthalsäure in der Säurekomponente) und BTA 60:40 (60 mol% Terephthalsäure in der Säurekomponente) wird ein aliphatischer Polyester SP3:13 (aus 1,3-Propandiol und Brassylsäure synthetisiert) sowie die kommerziellen Estergruppen enthaltenden Polymere Bayer Tir 1874 (Polyesteramid der Firma Bayer AG), Bionolle (aliphatischer Polyester der Firma Showa Highpolymers) sowie der natürliche bakterielle Polyester P(3HB) abgebaut. Gegenüber P(3HB) weist das estergruppenspal- tende Enzym keine erkennbare Aktivität auf. Bayer Tir 1874 war zum Zeitpunkt der Probenahme schon vollständig solubili- siert und die angegebene Aktivität stellt einen Minimalwert dar. Die Ergebnisse sind in Figur 4 dargestellt.

5. Vergleich des erfindungsgemäßen esterspaltenden Enzyms mit der Lipase aus Pseudomonas sp.

In 6 ml physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,0) werden je- weils Filme aus ETA40:60 gegeben. Zu der Lösung werden je- weils 50 µg des jeweiligen Enzyms (erfindungsgemäßes ester- spaltendes Enzym bzw. Lipase aus Pseudomonas sp. von SIGMA Chemical Co., EC 3.1.1.3) gegeben. Der Ansatz wird bei der jeweiligen optimalen Temperatur der Enzyme inkubiert. Der Fortschritt des Abbaus wird durch Titration der gebildeten freien Säuren mit 0,1 M NaOH verfolgt. Das Ergebnis ist in Figur 5 dargestellt.

Im Vergleich zur Pseudomonas-sp.-Lipase kann mit dem erfin- dungsgemäßen Enzym eine wesentlich höhere Hydrolysegeschwin- digkeit erreicht werden.

6. Spaltung von Triglyceriden mit dem erfindungsgemäßen esterspaltenden Enzym und mit der Lipase von Pseudomonas sp.

0,5 ml der jeweiligen Triglyceride werden mit 5 ml einer Emulsionslösung (4,475 g NaCl, 0,103 g KH_2PO_4 in einem Gemisch aus 75 ml destilliertem Wasser und 135 ml Glycerin (99,5%) gelöst, mit 1,5 g Gummi-Arabicum versetzt und mit destilliertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt) und mit 4,5 ml destilliertem Wasser versetzt.

Die Substratlösung wird direkt vor Beginn des Enzymtestes angesetzt und mit Hilfe eines Ultraturrax' 1 min bei 13500 Upm homogenisiert.

Danach wird die Substratlösung mit der Enzymlösung versetzt (20 μg Enzym pro 6 ml Substratlösung), der pH-Wert auf pH 7,1 eingestellt und die Esterspaltungen durch Titration mit 0,1 M NaOH verfolgt. In Figur 6 sind die Ergebnisse für Triglyceride mit verschiedener Anzahl an C-Atomen in der Fettsäurekomponente dargestellt.

Es kann ein breites Spektrum an Fettsäuren gespalten werden.

7. Spaltung von Phthalsäureestern mit dem erfindungsgemäßen esterspaltenden Enzym und mit der Lipase von Pseudomonas sp.

Die Versuchsansätze entsprechen denen von Beispiel 6. Anstelle der Triglyceride werden Phthalsäureester mit unterschiedlichen Alkoholkomponenten eingesetzt. Während die Lipase aus *Pseudomonas sp.* nur den Dimethyl- und Diethylester spalten kann, hydrolysiert das erfindungsgemäße Enzym auch die Ester mit längerkettigen Alkoholen. Die Hydrolysegeschwindigkeiten

sind höher als die der *Pseudomonas*-sp.-Lipase. Die Ergebnisse sind in Figur 7 dargestellt.

Patentansprüche

1. Estergruppenspaltendes Enzym, das erhältlich ist, indem der Mikroorganismus *Thermomonospora fusca* in einem geeigneten Nährmedium, gegebenenfalls in Anwesenheit eines Induktors, kultiviert wird.
2. Estergruppenspaltendes Enzym nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem Mikroorganismus um einen *Thermomonospora fusca*-Stamm handelt, der bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter der Zugangsnummer DSM 43793 hinterlegt ist.
3. Estergruppenspaltendes Enzym nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das Enzym aus dem Nährmedium isoliert wird, indem aus dem Nährmedium ein enzymhaltiger Kulturüberstand gewonnen wird, der gegebenenfalls konzentriert werden kann, und

durch Chromatographie, insbesondere durch Ionenaustausch- und/oder hydrophobe Interaktionschromatographie, das Enzym gereinigt wird.

4. Estergruppenspaltendes Enzym nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das Enzym durch folgende Parameter gekennzeichnet ist:

Molmasse: 27400 D (durch SDS-Gelelektrophorese bestimmt)
bzw. 28200 D (aus der Aminosäuresequenz berechnet)

Temperaturoptimum/-bereich: 65°C (30-80°C),

Temperaturstabilität: 70°C/30 min,

pH-Optimum/-bereich: 6-7 (4- >8),

Isoelektrischen Punkt: 6,4.

5. Estergruppenspaltendes Enzym nach einem der vorherigen Ansprüche, gekennzeichnet durch die folgende Aminosäuresequenz:

ANPYERGPNP TDALLEASSG PFSVSEENV S RLSASGFGGG TIYPREN

NTYGAVAI SP GYTGTEASIA WLGERIASHG FVVITIDTIT TLDQPDSRAE

QLNAALNHMI NRASSTVRSR IDSSRLAVMG HSMGGGGTLR LASQRPDLKA

AIPLTPWHLN KNWSSVTVP T LIIGADLDTI APVATHAKFF YNSLPSSISK

AYLELDGATH FAPNIPNKII GKYSVAWLKR FVDNDTRYTQ FLCPGPRDGL

FGEVEEYRST CPF

oder

durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren entstandene Mutanten, die isofunktionelle Enzyme ergeben.

6. Synthetisches Peptid oder Protein mit der Aminosäuresequenz des estergruppenspaltenden Enzyms nach Anspruch 5 oder eines Teils dieser Sequenz davon.

7. Polyklonaler Antikörper, der spezifisch gegen ein ester-spaltendes Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder gegen ein synthetisches Peptid oder Protein nach Anspruch 6 gerichtet ist.
8. Monoklonaler Antikörper, der spezifisch gegen ein ester-spaltendes Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder gegen ein synthetisches Peptid oder Protein nach Anspruch 6 gerichtet ist.
9. Hybridomzelle, die einen monoklonalen Antikörper nach Anspruch 8 bildet.
10. Estergruppenspaltende Zusammensetzung, die ein estergruppenspaltendes Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 und/oder ein synthetisches Peptid oder Protein nach Anspruch 6 sowie gegebenenfalls zusätzliche Enzyme, Stabilisatoren, geeignete oberflächenaktive Substanzen und/oder geeignete organische Lösungsmittel enthält.
11. Estergruppenspaltende Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei die zusätzlichen Enzyme Hydrolasen, insbesondere Esterasen, Proteasen, Cutinasen, Lipasen, Phospholipasen und Lysophospholipasen, sind.
12. Estergruppenspaltende Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei die Hydrolasen aus unter *Pseudomonas* sp., *Rizomucor miehei*, *Candida cylindracea*, *Candida antartica*, *Aspergillus niger*, *Chromobacterium viscosum*, *Commamonas acidovorans*, *Rhizopus arrhizus* und *Rhizopus delamar* ausgewählten Mikroorganismen stammen.

13. Verwendung eines estergruppenspaltenden Enzyms nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder eines synthetischen Peptids oder Proteins nach Anspruch 8 oder einer estergruppenspaltenden Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 10 bis 12 zum Abbau von Estergruppen enthaltenden niedermolekularen und/oder makromolekularen synthetischen oder natürlichen Verbindungen.
14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei es sich bei den Estergruppen enthaltenden makromolekularen Verbindungen um aliphatische, cycloaliphatische, aliphatisch-aromatische, teilaromatische oder aromatische Polyester bzw. Copolyester, Polyesteramide, Polyestercarbonate oder Polyesterurethane handelt, die kettenverlängert, verzweigt oder vernetzt sein können.
15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei die Estergruppen enthaltenden makromolekularen Verbindungen Copolymere, Mischungen bzw. Blends, Composites, Lamine oder Verklebungen mit anderen Werkstoffen bilden.



Fig. 1

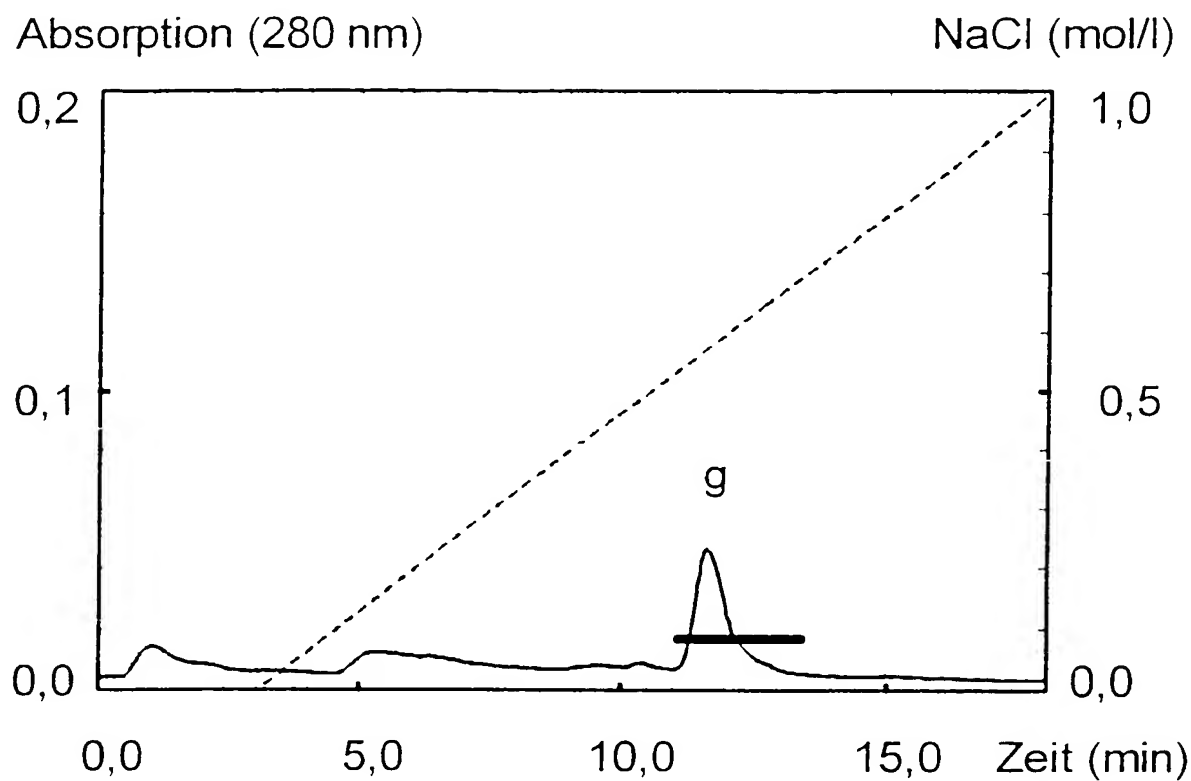


Fig. 2

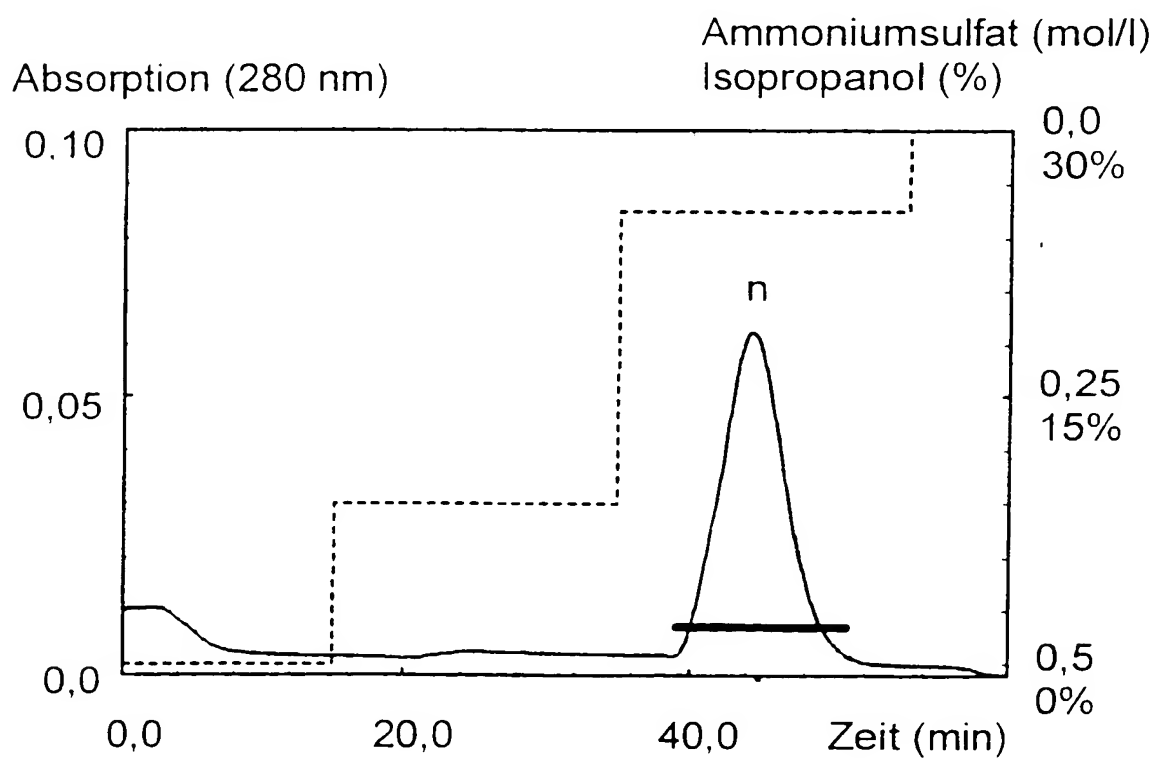




Fig. 3

Q59798	DNPYERGPA	PTRASIEAPR	GPYAVSQTSV	SSLVVSGFGG	40
Q56008	ANPYERGPA	PTNASIEASR	GPYATSQTSV	SSLVASGFGG	40
EGS-Enzym	.ANPYERGPN	PTDALLEASS	GPFSVSEENV	SRLSASGFGG	39
Consensus	.ANPYERGPA	PT.ASIEASR	GPYAVSQTSV	SSLVASGFGG	40
Q59798	GTIYYPTSTG	DGTFGAVVVT	PGFTATESSM	AWLGPRLASQ	80
Q56008	GTIYYPTSTA	DGTFGAVVIS	PGFTAYQSSI	AWLGPRLASQ	80
EGS-Enzym	GTIYYPRE--	NNTYGAVAIS	PGYTGTEASI	AWLGERIASH	77
Consensus	GTIYYPTST.	DGTFGAVVIS	PGFTATESSI	AWLGPRLASQ	80
Q59798	GFVVFTIDTL	TTLDQPDSPG	RQMLAALDYL	TER--SSART	118
Q56008	GFVVFTIDTN	TTLDQPDSPG	RQLLSALDYL	TQR--SSVRT	118
EGS-Enzym	GFVVITIDTI	TTLDQPDSPG	EQLNAALNHM	INRASSTVRS	117
Consensus	GFVVFTIDT.	TTLDQPDSPG	RQLLAALDYL	T.F...SSVRT	120
Q59798	RIDGTRLGVI	GHSMSGGGTL	EAAKSRPSLK	AAIPLTPWNL	158
Q56008	RVDATRLGVM	GHSMSGGGSL	EAAKSRTSLK	AAIPLTGWNT	158
EGS-Enzym	RIDSSRLAVM	GHSMSGGGTL	RLASQRPDLK	AAIPLTPWHL	157
Consensus	RID.TRLGVM	GHSMSGGGTL	E.AKSRPSLK	AAIPLTPWNL	160
Q59798	DKTWPEVTTP	TLVVGADGDT	VAPVATHAKP	FYSSLPSSTD	198
Q56008	DKTWPELRTP	TLVVGADGDT	VAPVATHSKP	FYESLPGSLD	198
EGS-Enzym	NKNWSSVTVP	TLIIGADLDT	IAPVATHAKP	FYNLSLPSSIS	197
Consensus	DKTWPEVTTP	TLVVGADGDT	VAPVATHAKP	FY.SLPSS.D	200
Q59798	RAYLELNNAT	HFAPNLSNTT	IAKYSVSWLK	RFIDDDTRYE	238
Q56008	KAYLELRGAS	HFTPNTSDTT	IAKYSISWLK	RFIDSDTRYE	238
EGS-Enzym	RAYLELDGAT	HFAPNIPNKI	IGKYSVAWLK	RFVDNDTRYT	237
Consensus	RAYLEL.GAT	HFAPN.SNTT	IAKYSVSWLK	RFID.DTRYE	240
Q59798	QFLCPLPVPD	R--DIEEYRG	TCPLGG	262	
Q56008	QFLCPIPRPS	L--TIAEYRG	TCPHTS	262	
EGS-Enzym	QFLCPGPRDG	LFGEVEEYRS	TCPF--	261	
Consensus	QFLCP.PR.P.	L...IEEYRG	TCP...	266	

Q56008: triacylglycerol acyl hydrolase

Q59798: triacylglycerol lipase



Fig. 4

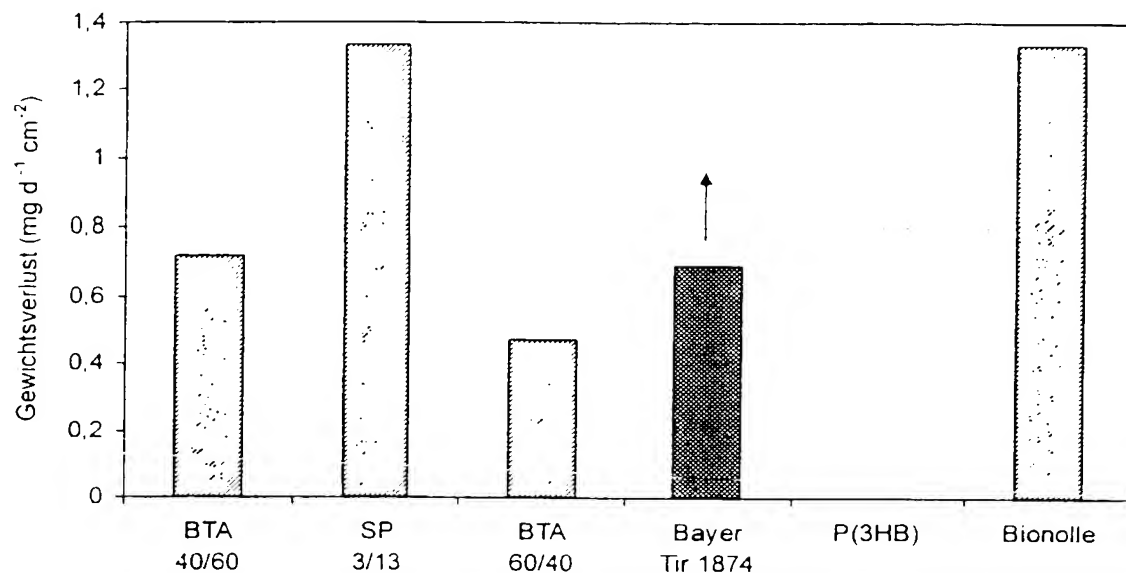


Fig. 5

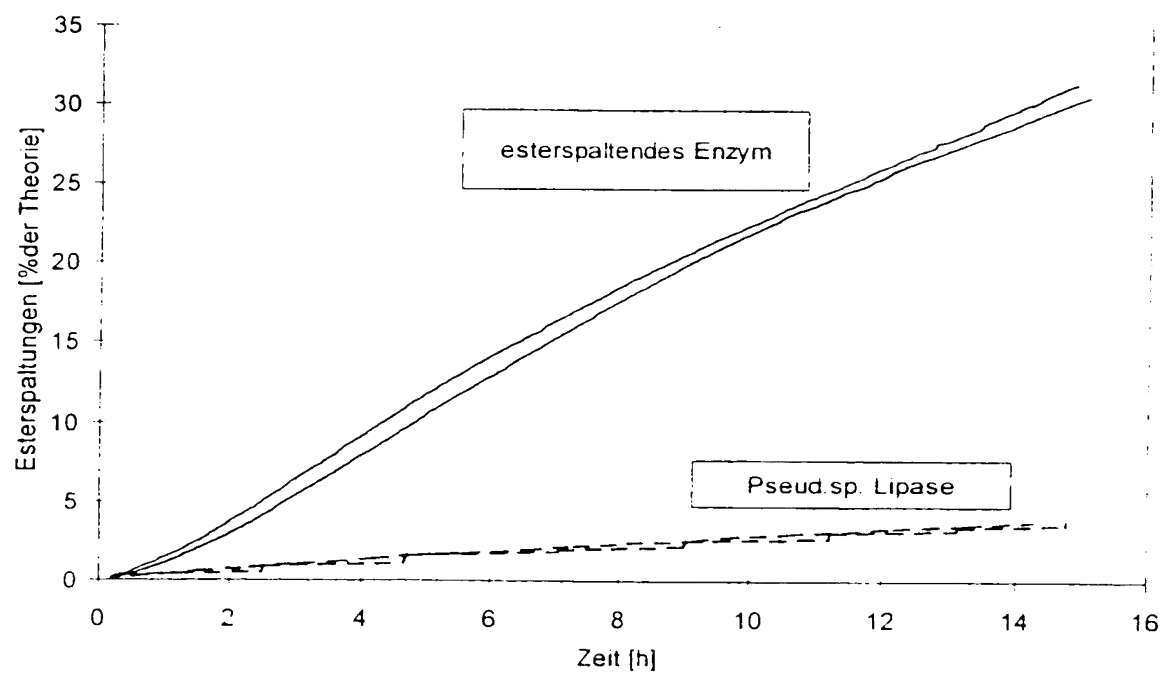




Fig. 6

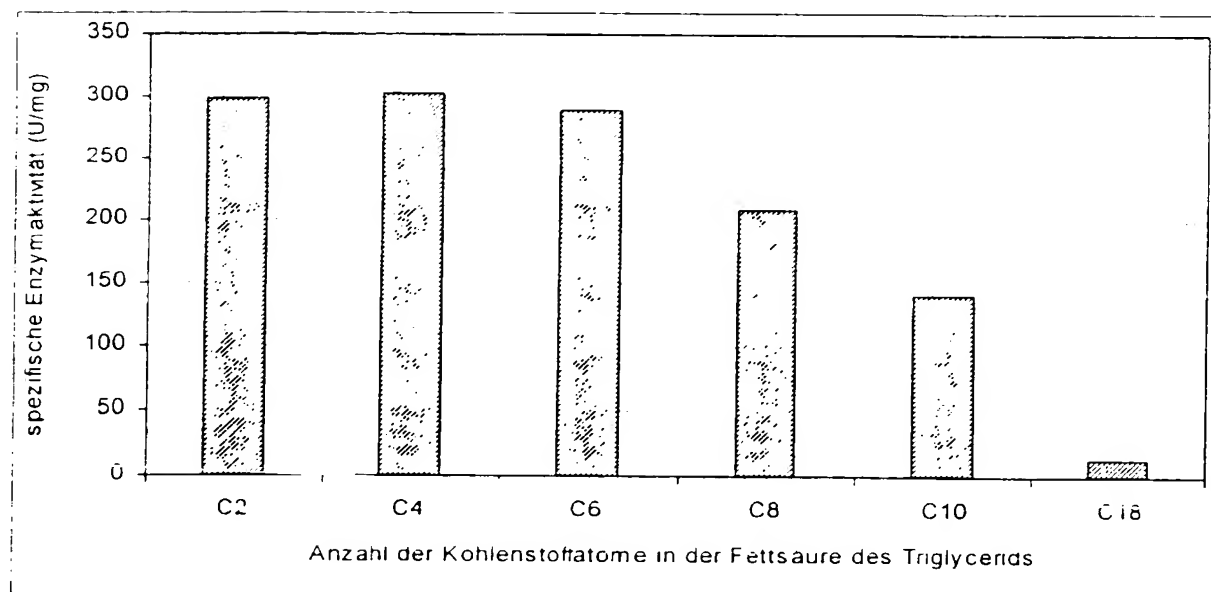
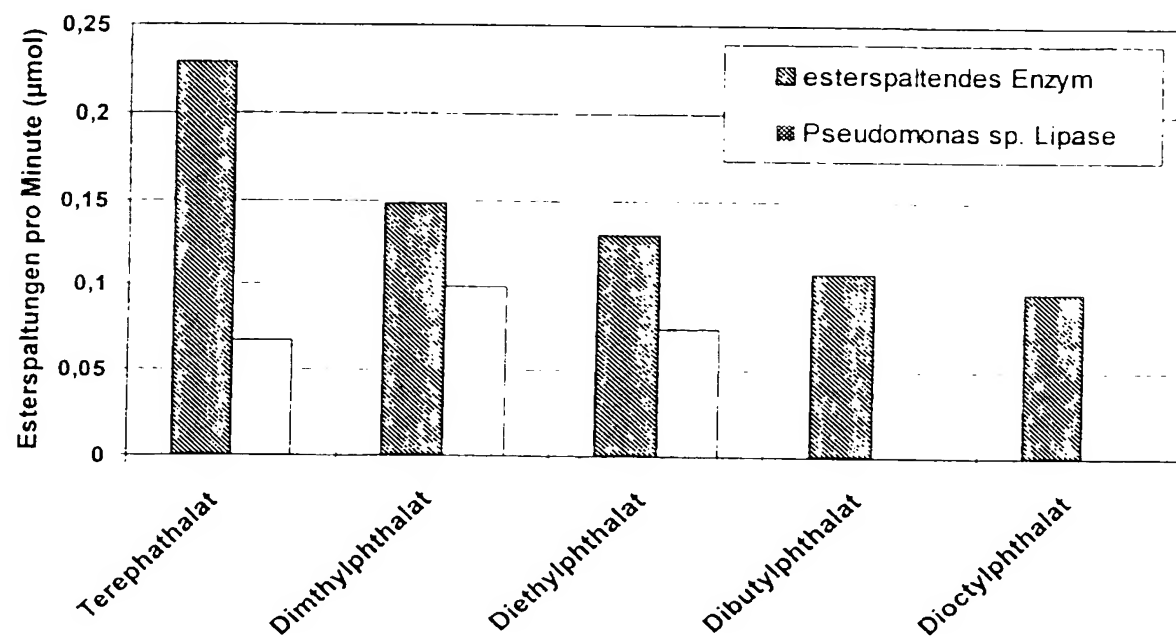


Fig. 7





INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In ☐ Aktuelles Aktenzeichen

PCT 00/07115

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/55 C12N9/18 C12N5/12 C07K16/40 C12P7/64

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole):

IPK 7 C12N C12P C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe):

BIOSIS, EMBASE, EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BIOTECHNOLOGY ABS, SCISEARCH, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BACHMANN S L ET AL: "PURIFICATION AND COOPERATIVE ACTIVITY OF ENZYMES CONSTITUTING THE XYLAN-DEGRADING SYSTEM OF THERMOMONOSPORA-FUSCA" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 57, Nr. 8, 1991, Seiten 2121-2130, XP000979271 ISSN: 0099-2240	1-3, 7-11,13
Y	Zusammenfassung Seite 2125, linke Spalte, Absatz 2 -Seite 2126, linke Spalte; Abbildung 4; Tabelle 3 --- -/--	4-6,12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Februar 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

21/02/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gurdjian, D

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HOLLICK G E: "ENZYMATIC PROFILES OF SELECTED THERMOPHILIC ACTINOMYCETES" MICROBIOS, Bd. 35, Nr. 141-142, 1982, Seiten 187-196, XP000979248 ISSN: 0026-2633	1,2, 7-11,13
Y	Zusammenfassung; Tabelle 3	4-6,12, 14,15
X	----- MCCARTHY A J ET AL: "Xylan-degrading enzymes produced by the thermophilic actinomycete Thermomonospora fusca" PROG.BIOTECHNOL., 1992, Bd. 7, 1992, Seiten 309-13, XP000979410 Zusammenfassung; Tabelle 1	1-3, 7-11,13
Y	----- CRUZ HUGO ET AL: "Sequence of the Streptomyces albus G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family." GENE (AMSTERDAM), Bd. 144, Nr. 1, 1994, Seiten 141-142, XP002159117 ISSN: 0378-1119 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Abbildung 1	4-6
Y	----- PEREZ CRISTINA ET AL: "Cloning, characterization, and expression in Streptomyces lividans 66 of an extracellular lipase-encoding gene from Streptomyces sp. M11." GENE (AMSTERDAM), Bd. 123, Nr. 1, 1993, Seiten 109-114, XP002159118 ISSN: 0378-1119 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Abbildung 3	4-6
Y	----- DE 197 06 023 A (BAYER AG) 20. August 1998 (1998-08-20) Zusammenfassung; Ansprüche 1-6	14,15
Y	----- WO 95 25707 A (BIOTAL LTD ;MANN STEPHEN PHILIP (GB); WARD JOHN STEWART (GB)) 28. September 1995 (1995-09-28)	12
A	Ansprüche 1,8	7-11, 13-15
	----- -/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>KEMPF, ALEXANDER ET AL: "Screening of thermophilic actinomycetes for biopolymer degrading enzymes"</p> <p>DECHEMA BIOTECHNOL. CONF. (1989), 3(PT. A, JT. MEET. SIM DECHEMA, PRESENTATION BIOCHEM. LAB., MICROB. PRINCK.BIOPROCESSES, APPL. GENET.), 159-62</p> <p>XP000979280</p> <p>Zusammenfassung; Tabelle 3</p> <p>-----</p>	<p>1-3.</p> <p>7-11.</p> <p>13-15</p>

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung und zur selben Patentfamilie gehören

tionales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07115

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19706023 A	20-08-1998	AU 6099398 A	08-09-1998
		WO 9836086 A	20-08-1998
		EP 0968300 A	05-01-2000
WO 9525707 A	28-09-1995	AT 188203 T	15-01-2000
		DE 69514218 D	03-02-2000
		EP 0751923 A	08-01-1997

Gesellschaft für Biotechnolo-
gische Forschung GmbH

Unser Zeichen: 10892
Neue internationale Patentanmeldung

Estergruppenspaltendes Enzym aus Thermomonospora fusca

Die Erfindung betrifft ein estergruppenspaltendes Enzym (im folgenden auch EGS-Enzym genannt) aus Thermomonospora fusca, ein Verfahren zu dessen Herstellung sowie seine Verwendung zum Abbau bzw. zur Behandlung von Estergruppen enthaltenden Polymeren und niedermolekularen Verbindungen.

Einleitung und Stand der Technik

Polymere und makromolekulare Werkstoffe, die einem kontrollierten biologischen Abbau unterliegen können, gewinnen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Eine Reihe von derartigen Produkten sind auf dem Markt bereits im industriellen Maßstab verfügbar. Innerhalb dieser neuartigen Produkte nehmen Estergruppen enthaltende Polymere (z.B. Polyester, Polyesterurethane, Polyesteramide) eine zentrale Rolle ein. Beispiele für bioabbaubare Kunststoffe auf Polyesterbasis sind z.B. Poly(β -hydroxybutyrat-co- β -hydroxyvalerat), Poly(ϵ -caprolacton) oder Poly(butylensuccinat).



Da Polymere aufgrund ihrer Molekülgröße die äußere Membran der mikrobiellen Zellen nicht passieren können, ist der erste und in der Regel geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Abbaus eine Molmassenreduzierung (Depolymerisierung) durch extrazelluläre Enzyme. Polyester sind deshalb potentiell bioabbaubar, da die Esterbindungen grundsätzliche Angriffspunkte für solche extrazellulären hydrolysierenden Enzyme darstellen

Für aliphatische Polyester sind seit langem Untersuchungen zum biologischen Abbau mit Hilfe solcher hydrolysierenden Enzyme (z.B. Lipasen, PHB-Depolymerasen) bekannt [Tokiwa et al., Polym. Mater. Sci. Eng. 62(1990), 988-992] [Jendrossek et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 46(1996), 451-463]. Das Material wird mit einem entsprechenden Enzym unter geeigneten Bedingungen inkubiert und der Abbau über die Bildung von Spaltprodukten im umgebenden Medium oder über den Gewichtsverlust der Proben bestimmt. Für die natürlichen Polyhydroxyalkanoate wurden in der Regel hierfür speziell isolierte Hydrolysen (PHB-Depolymerasen) eingesetzt, während für den Abbau synthetischer Polyester nicht speziell für den Zweck des Polymerabbaus isolierte kommerzielle Lipasen etc. verwendet wurden.

Während viele aliphatische Polyester sich grundsätzlich als biologisch angreifbar erwiesen haben, gelten aromatische Polyester [z.B. Poly(ethylenterephthalat), Poly(propylenterephthalat), Polybutylenterephthalat)] bekanntermaßen als biologisch resistent. Um die vergleichsweise zu aliphatischen Polyestern besseren Verarbeitungs- und Anwendungseigenschaften der aromatischen Strukturen zu nutzen, sind in den letzten Jahren biologisch abbaubare aliphatische-aromatische Co-



polyester entwickelt worden und werden in industriellem Maßstab hergestellt [Presseinformation der BASF AG, Ludwigshafen, zur K'98-Messe in Düsseldorf vom 17.03.98].

Durch die Einführung der aromatischen Komponenten wird jedoch die biologische Abbaugeschwindigkeit signifikant vermindert [Müller et al., Polym. Degrad. Stab. 59 (1998), S. 203-208]. So kommen z.B. Jun et al. [Jun et al., J. Environ. Polym. Degrad. 2(1) (1994), S. 9-18] zu dem Schluß, daß Copolyester aus PET und PCL nicht signifikant durch Lipasen (z.B. Pseudomonas-sp.-Lipase) angegriffen werden.

Ein Abbau von insbesondere Polyesteramiden mit verschiedenen üblichen kommerziellen Lipasen unter technischen Aspekten ist kürzlich beschrieben worden [WO 98/36086]. In diesem Patent wird auch die Auflösung eines Copolyesters aus Butandiol, Terephthalat (40 Mol.-%) und Adipat (60 Mol.-%) beschrieben. Die vermeintlich für technische Anwendungen geeignete Reaktionen werden durch beispielweise 50 mg Enzym (Lipase aus *Candida antarctica*) zu 0,3-1,8 g eines Polyesteramides in Folien- bzw. Plattenform erreicht. Die erzielten Abbauraten liegen im Bereich von 600 mg Abbau/Woche. Für den beschriebenen Abbau des aliphatisch-aromatischen Copolyesters muß eine Enzymmenge von 1% (in 100 ml Puffer) zu einem feinen Pulver des Copolyesters gegeben werden. Trotz der durch die kleine Partikelgröße bedingten erheblich größeren Oberfläche wird hier nur ein Abbau von 230 mg/Woche erreicht.

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß aliphatisch-aromatische Copolyester durch Mikroorganismenstämme aus der Gruppe der Actinomyceten abgebaut werden können [Kleeberg et al., Appl. Environ. Polym. Degrad. 64(5) (1998), 1731-1735].



Trotzdem besteht immer noch ein Bedarf nach einem hochaktiven estergruppenspaltenden Enzym, daß Polymere auf Polyesterbasis abbauen kann.

Überraschenderweise wurde erfindungsgemäß gefunden, daß biologisch abbaubare, Polyestergruppen enthaltende Polymere, insbesondere auch aliphatisch-aromatische Copolyester, mit dem erfindungsgemäßen, im folgenden näher spezifizierten, extrazellulären Enzym aus dem zu den Actinomyceten gehörenden Mikroorganismus *Thermomonospora fusca*, insbesondere des Stammes *Thermomonospora fusca* DSM 43793, alleine oder im Gemisch mit anderen Enzymen mit einer außergewöhnlich hohen Abbaugeschwindigkeit bzw. -rate depolymerisiert und in niedermolekulare Bruchstücke zerlegt werden können.

Die Erfindung betrifft somit ein estergruppenspaltendes Enzym nach Patentanspruch 1, ein synthetisches Peptid oder Protein nach Patentanspruch 6, polyklonale bzw. monoklonale Antikörper nach Patentanspruch 7 bzw. 8, Hybridomzellen nach Patentanspruch 9, eine estergruppenspaltende Zusammensetzung nach Patentanspruch 11 sowie die Verwendung eines estergruppenspaltenden Enzyms, synthetischen Peptids oder Proteins oder einer estergruppenspaltenden Zusammensetzung nach Patentanspruch 13.

Vorteilhafte Ausführungsformen sind Gegenstand der Unteransprüche.

Konkreter, jedoch ohne Einschränkung, betrifft die Erfindung ein estergruppenspaltendes Enzym, das erhältlich ist, indem der Mikroorganismus *Thermomonospora fusca* in einem geeigneten



Nährmedium, gegebenenfalls in Anwesenheit eines Induktors, kultiviert wird.

Vorzugsweise stammt das erfindungsgemäße estergruppenspaltende Enzym aus dem *Thermomonospora-fusca*-Stamm, der bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter der Zugangsnummer DSM 43793 hinterlegt ist.

Die Kultivierung kann durch im Batch-, Fed-Batch- oder kontinuierlichen Betrieb in synthetischen oder komplexen Medien erfolgen. Die Mikroorganismen können dabei frei vorliegen oder an einem festen Träger immobilisiert sein. Grundsätzlich kommen sowohl natürliche als auch genetisch veränderte Mikroorganismen in Frage.

Geeignete Induktoren für die Ausscheidung des Enzyms sind beispielsweise die Substrate selber, z.B. aliphatische Polyester und/oder Oligoester, aliphatisch-aromatische Copolyester.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße estergruppenspaltende Enzym außerdem aus dem Nährmedium isoliert, indem aus dem Nährmedium ein enzymhaltiger Kulturüberstand gewonnen wird, beispielsweise durch Zentrifugation, der gegebenenfalls konzentriert werden kann, beispielsweise durch Ultrafiltration und/oder Ammoniumsulfatfällung, worauf mit üblichen biochemischen Reinigungsmethoden, beispielsweise durch Chromatographie, insbesondere durch Ionenaustausch- und/oder hydrophobe Interaktionschromatographie, das Enzym gereinigt wird.



Das erfindungsgemäße estergruppenspaltende Enzym aus *Thermomonospora fusca* DSM 43793 ist durch folgende Parameter gekennzeichnet:

Molmasse: 27400 D (durch SDS-Gelelektrophorese bestimmt) bzw. 28200 D (aus der Aminosäuresequenz berechnet)

Temperaturoptimum/-bereich: 65°C (30-80°C),

Temperaturstabilität: 70°C/30 min,

pH-Optimum/-bereich: 6-7 (4- >8),

Isoelektrischen Punkt: 6,4.

Die Substratspezifität umfaßt Estergruppen enthaltende Polymere, Triglyceride, Phthalsäureester.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform hat das erfindungsgemäße estergruppenspaltende Enzym aus *Thermomonospora* DSM 43793 die folgende Aminosäuresequenz:

ANPYERGPNP TDALLEASSG PFSVSEENV S RLSASGFGGG TIYYPREN

NTYGAVAI S F GYTGTEASIA WLGERIASHG FVVITIDTIT TLDQPDSRAE

QLNAALNHMI NRASSTVRSR IDSSRLAVMG HSMGGGGTLR LASQRFDLKA

AIPLTPWHLN KNWSSVTVPT LIIGADLDTI APVATHAKPF YNSLPSSISK

AYLELDGATH FAPNIPNKII GKYSVAWLKR FVDNDTRYTQ FLCPGPRDGL



FGEVEEYRST CPE

oder

durch eine durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren entstandene mutierte Aminosäuresequenz, die ein isofunktionelles Enzym ergibt.

Die obige Aminosäuresequenz oder Teile davon können selbstverständlich auch synthetisch nach herkömmlichen Verfahren hergestellt werden, beispielsweise mit einem automatischen "Peptide-Synthesizer".

Die Erfindung betrifft ferner polyklonale und monoklonale Antikörper, die spezifisch gegen ein erfindungsgemäßes ester-spaltendes Enzym oder gegen ein entsprechendes synthetisches Peptid oder Protein mit gleicher Funktion und/oder Aminosäuresequenz gerichtet sind, sowie Hybridomzellen, welche die monoklonalen Antikörper bilden. Die Herstellung von poly- oder monoklonalen Antikörpern bzw. die Herstellung der die letzteren bildenden Hybridome ist seit langem bekannt (vgl. beispielsweise: E. Harlow, D. Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; E. Lidell, I. Weeks, "Antikörper-Techniken", Spektrum Akademischer Verlag, 1996), so daß es keiner weiteren Erörterung bedarf.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung estergruppenspaltende Zusammensetzungen, die ein erfindungsgemäßes estergruppenspaltendes Enzym und/oder ein entsprechendes synthetisches Peptid oder Protein mit gleicher Funktion und/oder Aminosäuresequenz sowie gegebenenfalls zusätzliche Enzyme, Stabilisa-



toren, geeignete oberflächenaktive Substanzen und/oder geeignete organische Lösungsmittel enthält.

Vorzugsweise handelt es sich bei den zusätzlichen Enzymen um Hydrolasen, insbesondere Esterasen, Proteasen, Cutinasen, Lipasen, Phospholipasen und Lysophospholipasen.

Besonders bevorzugt stammen diese Hydrolasen aus unter *Pseudomonas* sp., *Rizomucor miehei*, *Candida cylindracea*, *Candida antartica*, *Aspergillus niger*, *Chromobacterium viscosum*, *Comamonas acidovorans*, *Rhizopus arrhizus* und *Rhizopus delamar* ausgewählten Mikroorganismen. Besonders geeignet sind auch die in WO98/36086 (Bayer AG), auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird, offenbarten Mikroorganismen.

Die Erfindung gibt außerdem die Verwendung eines erfindungsgemäßen estergruppenspaltenden Enzyms oder eines synthetischen Peptids oder Proteins mit gleicher Funktion und/oder Aminosäuresequenz oder einer erfindungsgemäßen estergruppenspaltenden Zusammensetzung zum Abbau von Estergruppen enthaltenden niedermolekularen und/oder makromolekularen synthetischen oder natürlichen Verbindungen an.

Vorzugsweise handelt es sich bei den Estergruppen enthaltenden makromolekularen Verbindungen um aliphatische, cycloaliphatische, aliphatisch-aromatische, teilaromatische oder aromatische Polyester bzw. Copolyester, Polyesteramide, Polyestercarbonate oder Polyesterurethane, die kettenverlängert, verzweigt oder vernetzt sein können.

Die Estergruppen enthaltenden makromolekularen Verbindungen können beliebige Form haben und beispielsweise Copolymere,



Mischungen bzw. Blends, Composites, Lamine oder Verklebungen mit anderen Werkstoffen bilden.

In Verfahren zum Abbau von Estergruppen enthaltenden niedermolekularen und/oder makromolekularen (polymeren) Verbindungen unter Verwendung des erfindungsgemäßen estergruppenspaltenden Enzyms (oder eines anhand der Aminosäuresequenz synthetisch hergestellten Enzyms) oder einer dieses enthaltenden Zusammensetzung können Auflösungsgeschwindigkeiten erreicht werden, die denen von bislang bekannten Systemen deutlich überlegen sind und eine technische Nutzung der enzymatischen Behandlung von Estergruppen enthaltenden Polymeren ermöglichen. Dies gilt insbesondere für aliphatisch-aromatische Copolyester und Polyester-Blends, die eine hohe wirtschaftliche Bedeutung haben.

Die Verwendung des erfindungsgemäßen estergruppenspaltenden Enzyms (oder eines anhand der Aminosäuresequenz synthetisch hergestellten Enzyms) oder einer diese enthaltenden Zusammensetzung zur Behandlung der oben bzw. im folgenden genannten Polymeren in technisch relevanten Formen, beispielsweise Folien, Spritzgußteile, Beschichtungen, Lamine, Schäumen, Partikel, Verklebungen, kann zur Erhöhung der Metabolisierungsgeschwindigkeit durch Mikroorganismen, zur Aufarbeitung von Produkten im Rahmen eines Recyclings (z.B. zum Lösen von Verklebungen oder Entfernen von Beschichtungen) zur Rückgewinnung von Polymerbausteinen aus bioabbaubaren Polymeren oder zur Oberflächenmodifizierung von Produkten aus Polyestern dienen.

Die Behandlung der Polymeren mit einer geeigneten Enzymformulierung, beispielsweise in Form eines rohen Kulturüberstandes



von *Thermomonospora fusca*, der gegebenenfalls konzentriert werden kann, eines gereinigten Enzyms oder eines synthetischen Enzyms oder einer diese enthaltenden Zusammensetzung, kann beispielsweise in wäßriger Lösung oder durch Auftragen der Enzymformulierung auf die Polymermaterialien erfolgen.

Niedermolekulare Esterverbindungen spielen als Additive in verschiedenen Polymeren eine Rolle. Auch solche Verbindungen lassen sich mit dem erfindungsgemäßen Enzym spalten.

Die durch das erfindungsgemäße Enzym (oder durch ein anhand der Aminosäuresequenz synthetisch hergestellten Enzyms) und/oder die diese enthaltende Zusammensetzung abbaubaren estergruppenhaltigen Polymeren umfassen neben den bereits oben genannten beispielsweise folgende:

Estergruppen enthaltende synthetische und natürliche Polymere, insbesondere Lignine, Lignocellulose, Cutin, Suberin, aliphatische Polyester, insbesondere die in WO98/36086 (Bayer AG), auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird, offenbaren, besonders bevorzugt Polycaprolacton, aromatische oder teilaromatische Copolyester, insbesondere die in WO98/36086 (Bayer AG) offenbaren, besonders bevorzugt Terephthalsäure enthaltende, ganz besonders bevorzugt Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure (BTA), besonders bevorzugt mit einem Anteil von 30-70 Mol-% Terephthalsäure, Polyesteramide, insbesondere die in WO98/36086 (Bayer AG) offenbaren, Polymere, die Urethan- und Estergruppen enthalten, d. h. Polyesterurethane, und segmentierte Polyurethane.

Die Polyester können kettenverlängert, verzweigt oder vernetzt sein.



Besonders bevorzugte konkrete Polyester sind Poly(propylensuccinat), Poly(butylensuccinat), Poly(butylensuccinat-co-ethylensuccinat), ein Copolymer aus Bernsteinsäure/Adipinsäure/1,2-Ethandiol/1,4-Butandiol, Copolymere aus 1,4-Butandiol/Adipinsäure/Terephthalsäure.

Die durch das erfindungsgemäße Enzym (oder durch ein anhand der Aminosäuresequenz synthetisch hergestellten Enzyms) und/oder die diese enthaltende Zusammensetzung abbaubaren estergruppenhaltigen Polymeren können beispielsweise vorliegen als:

Copolymere oder Gemische (Blends) aus zwei oder mehreren der oben genannten Polymeren,

Composits oder Lamine aus zwei oder mehreren der oben genannten Polymeren oder deren Copolymeren oder Blends,

Composits, Lamine oder Verklebungen mit natürlichen oder modifizierten natürlichen polymeren Werkstoffen, insbesondere Stärke und/oder Cellulose (z. B. Papier),

Composits, Lamine oder Verklebungen mit anderen, nicht notwendigerweise bioabbaubaren Werkstoffen (z.B. Glas),

Polymerformulierungen, die übliche Füllmittel, Faserverstärkungen, Hilfsmittel, Stabilisatoren enthalten.

Die erfindungsgemäße Verwendung umfaßt die Behandlung von Polymeren in Form von Partikeln, Suspensionen, Emulsionen, Beschichtungen, Verklebungen, Filmen, Formkörpern, Fasern oder



Vliesen, Geweben, Schäumen. Die Materialien können chemisch, thermisch oder mechanisch vorbehandelt oder unbehandelt eingesetzt werden.

Das Enzym wird beispielsweise in gepufferter Lösung oder in ungepufferter Lösung, gegebenenfalls unter Einstellung des pH-Wertes verwendet.

Die Anwendung erfolgt beispielsweise durch Einbringen von Estergruppen enthaltenden Substanzen in geeignete Enzymlösungen oder durch Aufbringen einer geeigneten Enzymformulierung auf entsprechende Substanzoberflächen.

Weitere Verwendungsmöglichkeiten des erfindungsgemäßen Enzyms betreffen die Behandlung der oben definierten Materialien zum Zweck der Vorbehandlung im Zuge einer Entsorgung, die Behandlung der Materialien zur Trennung von Produktkomponenten, die Behandlung der Materialien zum Zweck der Rückgewinnung einzelner oder aller Materialbausteine und die Behandlung von Materialien zum Zweck der Änderung von Oberflächeneigenschaften.

Die folgenden Beispiele dienen zur Veranschaulichung der Erfindung und sind nicht als Beschränkung aufzufassen.

1. Kultivierung von Thermomonospora fusca DSM 43793.

Ein steriler mit Alukappen verschließbarer Kulturkolben ohne Schikanen wird zwei Zentimeter hoch mit sterilem Medium (entsprechend DIN V 54900, Teil 2) gefüllt. In den Kolben werden 3 g/l eines aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäureester und Adipinsäure synthetisierten Copolyesters gegeben und mit 1 Vol.-%



$\frac{1}{2}$ des Inoculums aus einer Vorkultur von *Thermomonospora fusca* beimpft. Die Kultur wird 18 h bei 55°C auf einem Rundschüttler mit 120 Upm inkubiert.

Nach Abbruch der Kultur werden die Feststoffe mit 8000 x g bei 10°C 20 min abzentrifugiert. Der Überstand enthält das esterspaltende Enzym.

2. Abbau eines aliphatisch-aromatischen Copolyesters mit *Thermomonospora fusca* im Kulturüberstand.

Thermomonospora fusca DSM 43793 wird in einem Mineralsalzmedium (siehe Beispiel 1) 24,8 h bei 55°C kultiviert. 2 ml des organismenfreien Kulturüberstandes werden in eine Reagenzglas gegeben. Ein runder Polymerfilm (Durchmesser 0,9 cm) aus einem Copolyester aus Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure (40 Mol.-% Terephthalsäure in der Säurekomponente) wird in den Kulturüberstand gegeben und 24 Stunden bei 55°C inkubiert. Der Gewichtsverlust des Films beträgt danach 2,575 mg/(cm² Oberfläche).

3. Isolierung des erfindungsgemäßen esterspaltenden Enzyms.

Konzentrierung:

Der Kulturüberstand aus Beispiel 1 wird in einer Amicon-Ultrafiltrationskammer (Volumen: 50 ml, Filtrationsfläche: 47 cm²) unter einem Druck von 3 bar und einer Membran mit einem Cut-off von 10 kDa auf 5% des ursprünglichen Volumens konzentriert.



Die weitere Reinigung erfolgt mit Hilfe einer Standard-FPLC-Anlage "LCC-Plus" mit automatischer Äquilibration, Injektion und Elution (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Das konzentrierte Protein im Kulturüberstand (2,1 mg) wird in einem ersten Schritt über eine Ionenaustauschersäule gereinigt.

Parameter:

Säule: UNO-Si-Säule (Säulenvolumen 1,3 ml, BioRad, München)

Startpuffer: 20 mM Citratpuffer (pH 4,0)

Elution: (linearer Gradient) 1 M NaCl im Startpuffer

Flußrate: 2 ml/min

Figur 1 zeigt das Elutionsprofil, wobei der schwarze Balken die Fraktionen markiert, die estergruppenspaltende Aktivität aufweisen.

In einem zweiten Schritt werden durch Ionenaustauschchromatographie erhaltene und Aktivität aufweisende Fraktionen durch hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) weiter gereinigt.

116 µg Protein aus durch Ionenaustauschchromatographie erhaltenen Fraktionen werden auf eine Phenylsepharosesäule aufgetragen

Säule: Phenylsepharose-CL4B-Säule (Säulenvolumen: 1,14 ml, Pharmacia, Uppsala, Schweden)



Startpuffer: 0,5 M Ammoniumsulfat in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,1)

Elution: (Stufengradient) 30% Isopropanol in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,1)

Flußrate: 0,3 ml/min.

Figur 2 zeigt das Elutionsprofil, wobei der schwarze Balken die Fraktionen markiert, die estergruppenspaltende Aktivität aufweisen.

Der Kulturüberstand weist eine spezifische Aktivität von 3,3 U/mg auf. Nach der Ionenaustauschchromatographie wird eine spezifische Aktivität von 218 U/mg und nach der HIC eine von 360 U/mg erhalten.

Charakterisierung des erfindungsgemäßen Enzyms.

Figur 3 zeigt die Aminosäuresequenz des erfindungsgemäßen Enzyms und das "Alignement" zum Sequenzvergleich mit der Triacylglycerol-Lipase aus *Streptomyces albus* G und der Triacylglycerol-Acylhydrolase aus *Streptomyces* sp. M11. Das "Multiple Alignment" wurde mit dem Programm "PileUp" erstellt (Wisconsin Package, Version 9.1, Genetics Computer Group, Madison, WI, USA). Voneinander abweichende Aminosäuren an gleichen Positionen sind schattiert dargestellt. Die schwarz umrandete Box markiert eine hochkonservierte Aminosäuresequenz aus dem Bereich des aktiven Zentrums von Lipasen. Die Sequenzen der beiden *Streptomyces*-Stämme stammen aus der SP-TREMBL-Datenbank (Release 7.0, 08/1993): Q56008 (*Streptomyces* sp. M11), Q59798 (*Streptomyces albus* G).



Zur Aminosäuresequenzierung wurde das EGS-Enzym von den nach der Reinigung noch vorhandenen Fremdproteinen isoliert. Dies erfolgte durch Auftrennung der Proteine mittels präparativer SDS-Gelelektrophorese und Übertragung auf eine PVDF-Membran durch Western-Blotting. Nach der Färbung der Proteinbanden wurde die Bande des Enzyms aus der Membran ausgeschnitten und sequenziert.

Zur Bestimmung der Gesamtsequenz wurde das Enzym mit Trypsin und GluC verdaut. Die Trennung der entstandenen Peptide erfolgte durch HPLC ("reversed phase"). Die N-terminale Sequenz und die Peptidfraktionen aus der Verdauung der BTA-Hydrolase wurden über einen "Edman-Abbau" in einem "Applied Biosystems 473A Sequencer" ("gas-phase-mode") oder in einem "494A Proci-se HT Sequencer" ("gas-phase"- und "pulsed-liquid-mode") mit Standardprogrammen des Herstellers analysiert.

Durch Sequenzüberlappung und durch Vergleich der Teilsequenzen des EGS-Enzyms mit den Aminosäuresequenzen zweier bekannter Streptomyces-Lipasen wurde die Gesamtsequenz des Enzyms bestimmt.

4. Abbau von Estergruppen enthaltenen Polymeren mit dem erfindungsgemäßen estergruppenspaltenden Enzym.

Unter sterilen Bedingungen wurde in Reagenzgläsern je ein Polymerfilm (d = 0,9 cm) mit 1 ml der gereinigten Enzymlösung (25 µg Enzym in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1) versetzt. Die Reagenzgläser wurden 17 h bei 55°C inkubiert. Der Gewichtsverlust der Polymerfilme diente als Maß für die Enzymaktivität.



Neben dem aliphatisch-aromatischen Copolyestern BTA40:60 (40 mol% Terephthalsäure in der Säurekomponente) und BTA 60:40 (60 mol% Terephthalsäure in der Säurekomponente) wird ein aliphatischer Polyester SP3:13 (aus 1,3-Propandiol und Brassylsäure synthetisiert) sowie die kommerziellen Estergruppen enthaltenden Polymere Bayer Tir 1874 (Polyesteramid der Firma Bayer AG), Bionolle (aliphatischer Polyester der Firma Showa Highpolymers) sowie der natürliche bakterielle Polyester P(3HB) abgebaut. Gegenüber P(3HB) weist das estergruppenspal-
tende Enzym keine erkennbare Aktivität auf. Bayer Tir 1874 war zum Zeitpunkt der Probenahme schon vollständig solubili-
siert und die angegebene Aktivität stellt einen Minimalwert dar. Die Ergebnisse sind in Figur 4 dargestellt.

5. Vergleich des erfindungsgemäßen esterspaltenden Enzyms mit der Lipase aus Pseudomonas sp.

In 6 ml physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,0) werden je-
weils Filme aus BTA40:60 gegeben. Zu der Lösung werden je-
weils 50 µg des jeweiligen Enzyms (erfindungsgemäßes ester-
spaltendes Enzym bzw. Lipase aus Pseudomonas sp. von SIGMA
Chemical Co., EC 3.1.1.3) gegeben. Der Ansatz wird bei der
jeweiligen optimalen Temperatur der Enzyme inkubiert. Der
Fortschritt des Abbaus wird durch Titration der gebildeten
freien Säuren mit 0,1 M NaOH verfolgt. Das Ergebnis ist in
Figur 5 dargestellt.

Im Vergleich zur Pseudomonas-sp.-Lipase kann mit dem erfin-
dungsgemäßen Enzym eine wesentlich höhere Hydrolysegeschwin-
digkeit erreicht werden.



6. Spaltung von Triglyceriden mit dem erfindungsgemäßen
esterspaltenden Enzym und mit der Lipase von Pseudomonas sp.

0,5 ml der jeweiligen Triglyceride werden mit 5 ml einer Emulsionslösung (4,475 g NaCl, 0,103 g KH_2PO_4 in einem Gemisch aus 75 ml destilliertem Wasser und 135 ml Glycerin (99,5%) gelöst, mit 1,5 g Gummi-Arabicum versetzt und mit destilliertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt) und mit 4,5 ml destilliertem Wasser versetzt.

Die Substratlösung wird direkt vor Beginn des Enzymtestes angesetzt und mit Hilfe eines Ultraturrax' 1 min bei 13500 Upm homogenisiert.

Danach wird die Substratlösung mit der Enzymlösung versetzt (20 µg Enzym pro 6 ml Substratlösung), der pH-Wert auf pH 7,1 eingestellt und die Esterspaltungen durch Titration mit 0,1 M NaOH verfolgt. In Figur 6 sind die Ergebnisse für Triglyceride mit verschiedener Anzahl an C-Atomen in der Fettsäurekomponente dargestellt.

Es kann ein breites Spektrum an Fettsäuren gespalten werden.

7. Spaltung von Phthalsäureestern mit dem erfindungsgemäßen
esterspaltenden Enzym und mit der Lipase von Pseudomonas sp.

Die Versuchsansätze entsprechen denen von Beispiel 6. Anstelle der Triglyceride werden Phthalsäureester mit unterschiedlichen Alkoholkomponenten eingesetzt. Während die Lipase aus *Pseudomonas sp.* nur den Dimethyl- und Diethylester spalten kann, hydrolysiert das erfindungsgemäße Enzym auch die Ester mit länger-kettigen Alkoholen. Die Hydrolysegeschwindigkeiten



sind höher als die der *Pseudomonas*-sp.-Lipase. Die Ergebnisse sind in Figur 7 dargestellt.



Patentansprüche

1. Estergruppenspaltendes Enzym, das erhältlich ist, indem der Mikroorganismus *Thermomonospora fusca* in einem geeigneten Nährmedium, gegebenenfalls in Anwesenheit eines Induktors, kultiviert wird.
2. Estergruppenspaltendes Enzym nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem Mikroorganismus um einen *Thermomonospora fusca*-Stamm handelt, der bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter der Zugangsnummer DSM 43793 hinterlegt ist.
3. Estergruppenspaltendes Enzym nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das Enzym aus dem Nährmedium isoliert wird, indem aus dem Nährmedium ein enzymhaltiger Kulturüberstand gewonnen wird, der gegebenenfalls konzentriert werden kann, und

durch Chromatographie, insbesondere durch Ionenaustausch- und/oder hydrophobe Interaktionschromatographie, das Enzym gereinigt wird.
4. Estergruppenspaltendes Enzym nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das Enzym durch folgende Parameter gekennzeichnet ist:

Molmasse: 27400 D (durch SDS-Gelelektrophorese bestimmt)
bzw. 26200 D (aus der Aminosäuresequenz berechnet)

Temperaturoptimum/-bereich: 65°C (30-80°C),



Temperaturstabilität: 70°C/30 min,

pH-Optimum/-bereich: 6-7 (4- >8),

Isoelektrischen Punkt: 6,4.

5. Estergruppenspaltendes Enzym nach einem der vorherigen Ansprüche, gekennzeichnet durch die folgende Aminosäuresequenz:

ANPYERGPNP TDALLEASSG PFSVSEENVN RLSASGFGGG TIYYPREN

NTYGAVAIAP GYTGTEASIA WLGERIASHG FVVITIDTIT TLDQPDRAE

QLNAALNHMI NRASSTVRSR IDSSRLAVMG HSMGGGGTLR LASQRPDLKA

AIPLTPWHLN KNWSSVTVP LITGADLOTI APVATHAKPF YNSLPSSISK

AYLELDGATH FAPNIPNKII GKYSVAWLKR FVDNDTRYTQ FLCPGPRDGL

FGEVEEYRST CPF

oder

durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren entstandene Mutanten, die isofunktionelle Enzyme ergeben.

6. Synthetisches Peptid oder Protein mit der Aminosäuresequenz des estergruppenspaltenden Enzyms nach Anspruch 5 oder eines Teils dieser Sequenz davon.



7. Polyklonaler Antikörper, der spezifisch gegen ein ester-spaltendes Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder gegen ein synthetisches Peptid oder Protein nach Anspruch 6 gerichtet ist.
8. Monoklonaler Antikörper, der spezifisch gegen ein ester-spaltendes Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder gegen ein synthetisches Peptid oder Protein nach Anspruch 6 gerichtet ist.
9. Hybridomzelle, die einen monoklonalen Antikörper nach Anspruch 8 bildet.
10. Estergruppenspaltende Zusammensetzung, die ein ester-gruppenspaltendes Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 und/oder ein synthetisches Peptid oder Protein nach Anspruch 6 sowie gegebenenfalls zusätzliche Enzyme, Stabilisatoren, geeignete oberflächenaktive Substanzen und/oder geeignete organische Lösungsmittel enthält.
11. Estergruppenspaltende Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei die zusätzlichen Enzyme Hydrolasen, insbesondere Esterasen, Proteasen, Cutinasen, Lipasen, Phospholipasen und Lysophospholipasen, sind.
12. Estergruppenspaltende Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei die Hydrolasen aus unter *Pseudomonas* sp., *Rizomucor miehei*, *Candida cylindracea*, *Candida antartica*, *Aspergillus niger*, *Chromobacterium viscosum*, *Comamonas acidovorans*, *Rhizopus arrhizus* und *Rhizopus delamar* ausgewählten Mikroorganismen stammen.



13. Verwendung eines estergruppenspaltenden Enzyms nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder eines synthetischen Peptids oder Proteins nach Anspruch 6 oder einer estergruppenspaltenden Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 10 bis 12 zum Abbau von Estergruppen enthaltenden niedermolekularen und/oder makromolekularen synthetischen oder natürlichen Verbindungen.
14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei es sich bei den Estergruppen enthaltenden makromolekularen Verbindungen um aliphatische, cycloaliphatische, aliphatisch-aromatische, teilaromatische oder aromatische Polyester bzw. Copolyester, Polyesteramide, Polyestercarbonate oder Polyesterurethane handelt, die kettenverlängert, verzweigt oder vernetzt sein können.
15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei die Estergruppen enthaltenden makromolekularen Verbindungen Copolymere, Mischungen bzw. Blends, Composites, Lamine oder Verklebungen mit anderen Werkstoffen bilden.



Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein estergruppenspaltendes Enzym, das erhältlich ist, indem der Mikroorganismus *Thermomonospora fusca* in einem geeigneten Nährmedium, gegebenenfalls in Anwesenheit eines Induktors, kultiviert wird.



Fig. 1

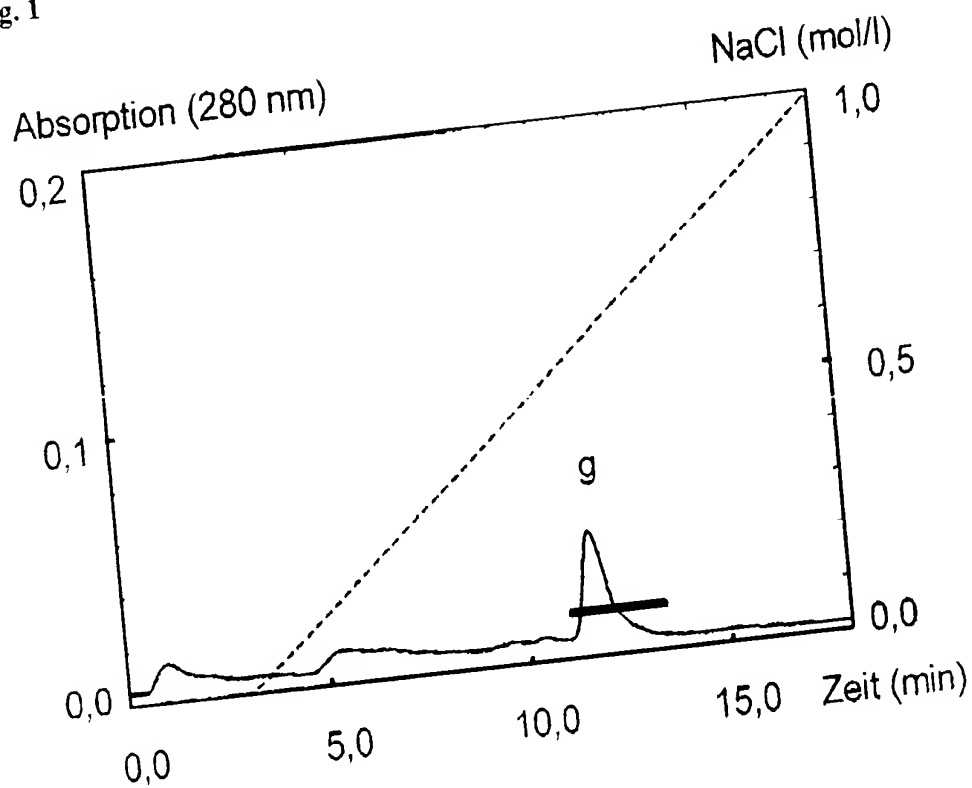
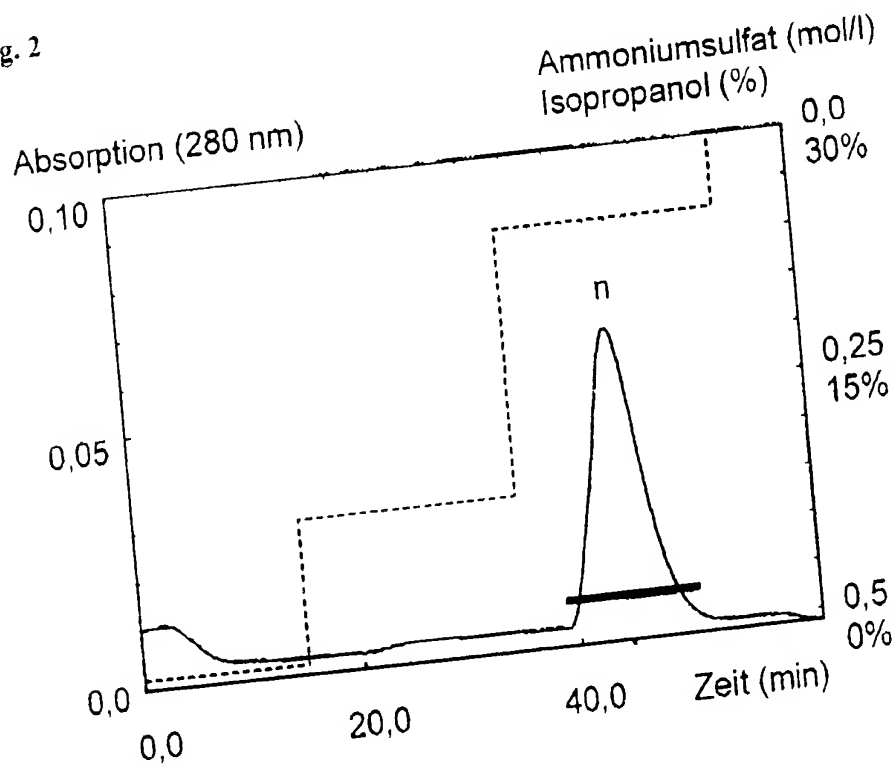


Fig. 2



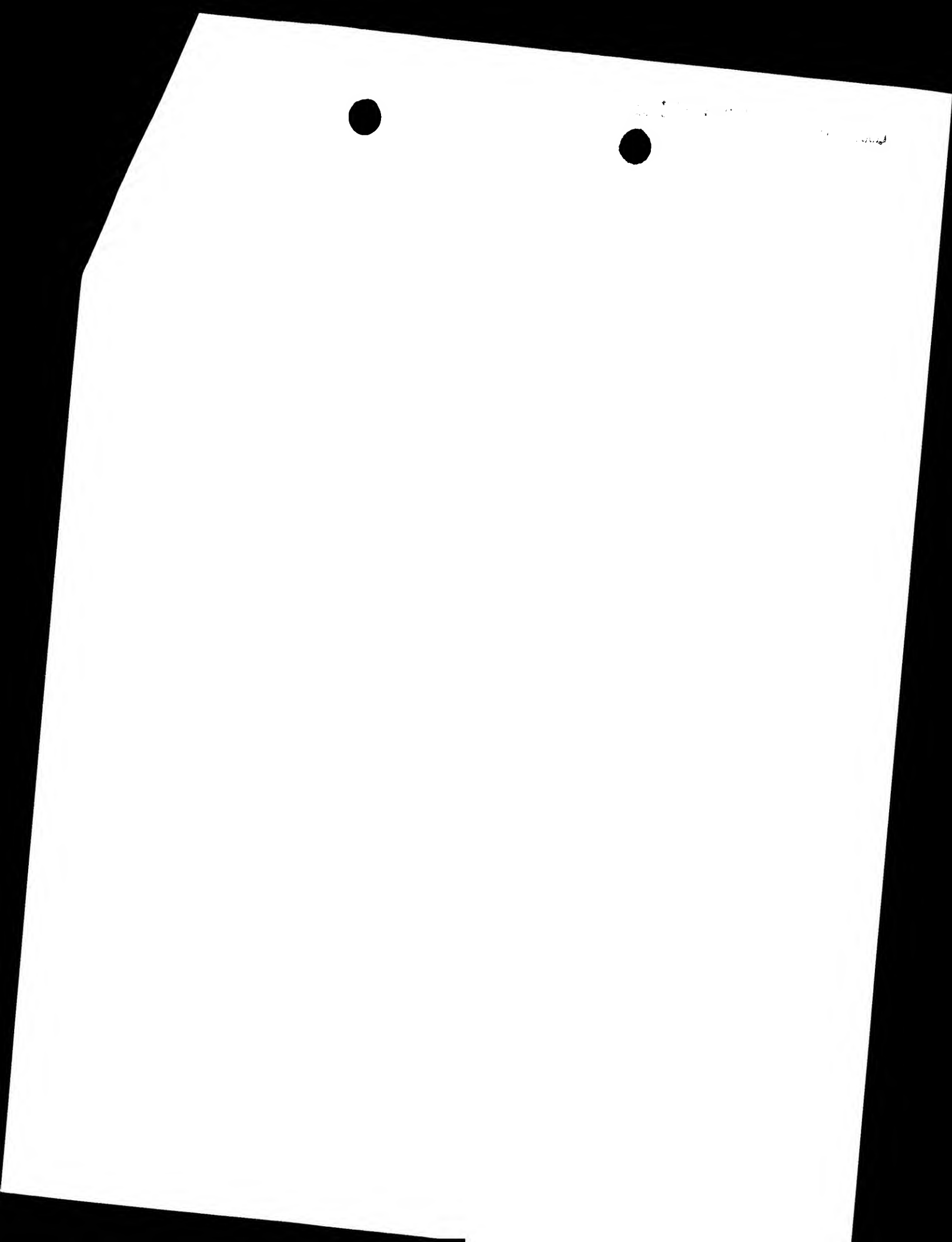


Fig. 3

Q59798	DNPYERGPA	PTRASIEAPR	GPYAVSQTSV	SSLVVSGFGG	40
Q56008	ANPYERGPA	PTNASIEASR	GPYATSQTSV	SSLVASGFGG	40
EGS-Enzym	ANPYERGN	PTDALLEASS	GPFSVSEENV	SRLSASGFGG	39
Consensus	ANPYERGPA	PTASIEASR	GPYAVSQTSV	SSLVASGFGG	40
Q59798	GTIIYPTSTG	DGTFGAVVVT	PGFTATESSM	AWLGPRLASQ	80
Q56008	GTIIYPTSTA	DGTFGAVVIS	PGFTAYQSSI	AWLGPRLASQ	80
EGS-Enzym	GTIIYPRE--	NNTYGAVAIS	PGYTGTEASI	AWLGERIASH	77
Consensus	GTIIYPTST	DGTFGAVVIS	PGFTATESSI	AWLGPRLASQ	80
Q59798	GFVVFTIDTL	TTLDQPDSRG	RQMLAALDYL	TER--SSART	118
Q56008	GFVVFTIDTN	TTLDQPDSRG	RQLLSALDYL	TQR--SSVRT	116
EGS-Enzym	GFVVITIDTI	TTLDQPDSRA	RQLNAALNHM	INRASSTVRS	117
Consensus	GFVVFTIDT	TTLDQPDSRG	RQLLAALDYL	T.R..SSVRT	120
Q59798	RIDGTRLGVI	GHSMGGGGTL	EAAKSRPSLK	AAIPLTPWNL	158
Q56008	RVDATRLGVM	GHSMGGGGSL	EAAKSRTSLK	AAIPLTGWNT	158
EGS-Enzym	RIDSSRLAVM	GHSMGGGGTL	RLASQRPDLK	AAIPLTPWHL	157
Consensus	RID.TRLGVM	GHSMGGGGTL	E.AKSRPSLK	AAIPLTPWNL	160
Q59798	DKIWPEVTTT	TLVVGADGDT	VAPVATHAKP	FYSSLPSSTD	198
Q56008	DKIWPELRTP	TLVVGADGDT	VAPVATHSKP	FYESLPGLSD	198
EGS-Enzym	NKNWSSVTVP	TLIIGADLDT	IAPVATHAKP	FYNSLPSSIS	197
Consensus	DKIWPEVTTT	TLVVGADGDT	VAPVATHAKP	FY.SLPSS.D	200
Q59798	RAYLELNNAT	HFAPNLSNTT	IAKYSVSWLK	RFIDDDTRYE	238
Q56008	KAYLELRGAS	HFTPNSTDTT	IAKYSISWLK	RFIDSDTRYE	238
EGS-Enzym	RAYLELDGAT	HFAPNIPNKI	IGKYSVAWLK	RFVDNDTRYT	237
Consensus	RAYLEL.GAT	HFAPN.SNTT	IAKYSVSWLK	RFID.DTRYE	240
Q59798	QFLCPLPVPD	R--DIEEYRG	TCPLGG	262	
Q56008	QFLCPIPRPS	L--TIAEYRG	TCPHTS	262	
EGS-Enzym	QFLCPGPRDG	LFGEVVEEYRS	TCPF--	261	
Consensus	QFLCP.PRP.	L...IEEYRG	TCP...	266	

Q56008: triacylglycerol acyl hydrolase

Q59798: triacylglycerol lipase



Fig. 4

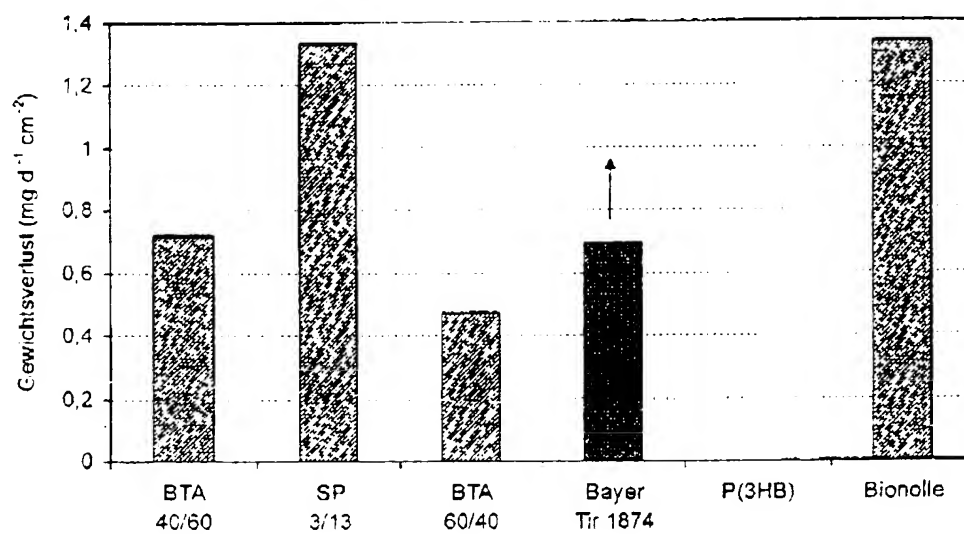
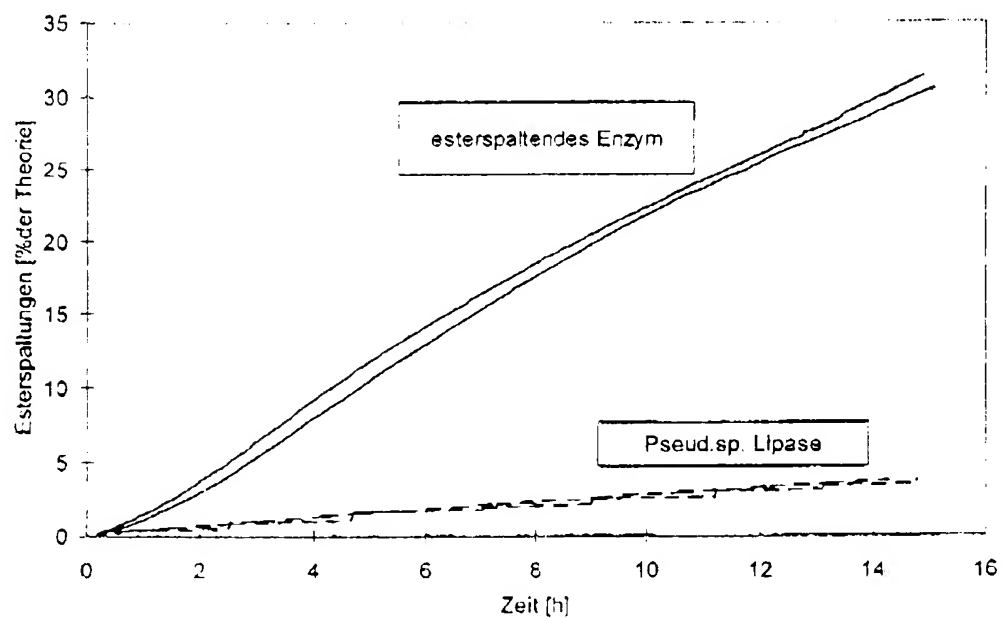


Fig. 5



JO1060000000 7 MAR 2012

Fig. 6

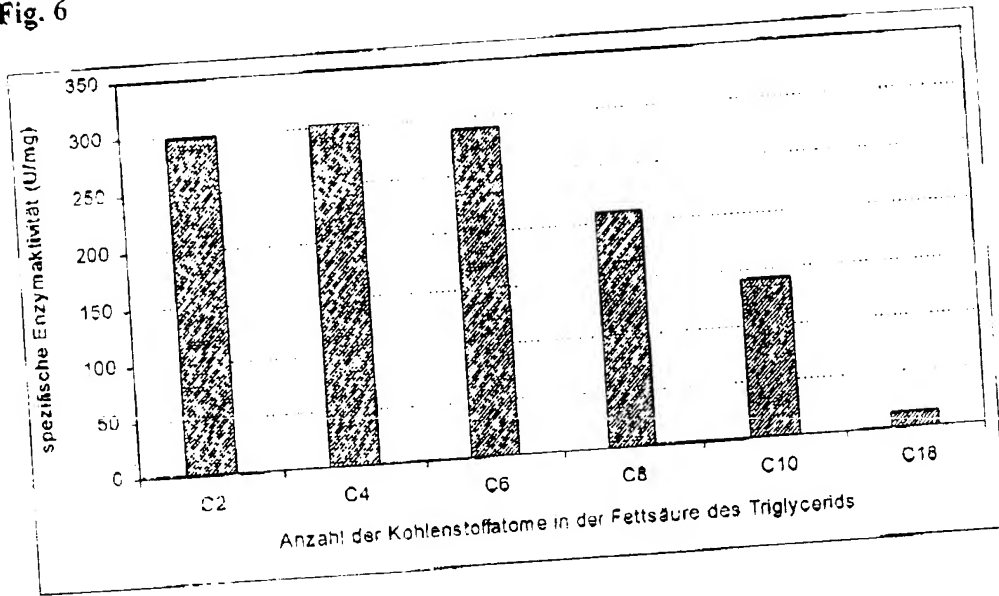
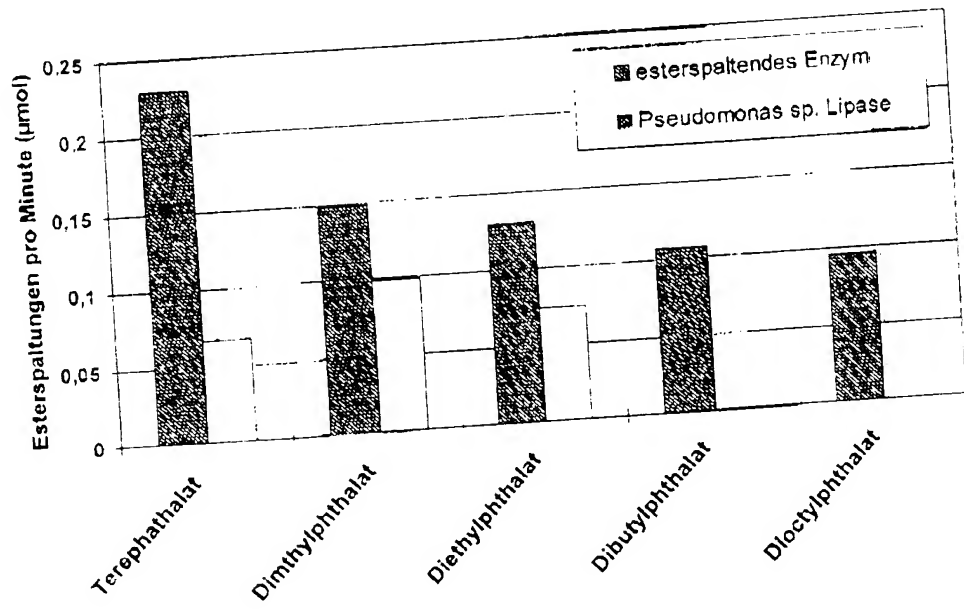


Fig. 7



IC10 Rec'd PCT/PTO 27 MAR 2002